HALOCHINON,
EIN NEUES ANTIBIOTICUM

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Beate Ewersmeyer-Wenk
geb. Ewersmeyer
aus Soest

1981

HALOCHINON,
EIN NEUES ANTIBIOTICUM

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Beate Ewersmeyer-Wenk
geb. Ewersmeyer
aus Soest

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		8. Januar 1981
Dekan	:	Professor Dr. A. Hager
1. Berichterstatter	:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	:	Priv.-Doz. Dr. H. Wolf

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.
Für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Der Arbeitsgruppe von Professor Dr. A. Zeeck, Organisch Chemisches Institut der Universität Göttingen, insbesondere Herrn Dr. B. Krone, gilt mein Dank für die Untersuchungen zur Strukturermittlung und Derivatisierung von Halochinon.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. E. Lederer, Laboratoire de Biochimie, C.N.R.S., Gif/Yvette, France, für die Überlassung von Pilochinon zu Vergleichszwecken.

Herrn K. Wusch danke ich für das Zeichnen der Abbildungen.

Den Mitarbeitern der Lehrbereiche Mikrobiologie I und II möchte ich für die gute Zusammenarbeit sowie wertvolle Anregungen und Hilfen danken.

Seite

8. Biologische Charakterisierung von Halochinon..... 24

8.1. Plattendiffusionstest..... 24

8.2. Verdünnungsreihentest..... 25

8.3. Versuche mit dem Biophotometer..... 26

8.4. Einbau radioaktiv markierter Bausteine der Protein-, RNS- und DNS-Synthese..... 26

8.5. Messung der Verschiebung im Absorptionsspektrum von Halochinon nach Inkubation mit DNS..... 27

III. ERGEBNISSE..... 29

1. Verwendungsmöglichkeiten von Halobakterien bei der Suche nach neuen Antibiotica..... 29

1.1. Wachstum und Hemmstoffproduktion bei Halobakterien..... 29

1.2. Antibioticasensitivität von Halobakterien.. 33

1.3. Einfluß von Detergens auf die Wirkung von Antibiotica bei Halobakterien..... 36

2. Beschreibung des Halochinonproduzenten..... 37

3. Optimierung der Halochinonproduktion..... 38

4. Herstellung von Halochinon..... 42

4.1. Fermentation..... 42

4.2. Aufarbeitung und Reinigung..... 44

5. Physikalische und chemische Eigenschaften von Halochinon..... 48

5.1. Löslichkeit..... 48

5.2. Stabilität..... 48

5.3. Dünnschichtchromatographie..... 49

5.4. Strukturermittlung von Halochinon..... 5o

6. Biologische Charakterisierung von Halochinon..... 55

6.1. Wirkungsspektrum..... 55

6.2. Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Wachstumsphase des Testorganismus im Biophotometerversuch..... 6o

6.3. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Halochinonkonzentration und der Diffusionsmöglichkeit - Standardisierung der Testplatten..... 63

Seite

6.4. Einfluß von Halochinon auf die Makromolekülsynthese in vivo..... 65

6.5. Interaktion von Halochinon mit Kalbsthymus-DNS in vitro..... 58

IV. DISKUSSION..... 69

V. ZUSAMMENFASSUNG..... 81

VI. LITERATURVERZEICHNIS..... 82

I. EINLEITUNG

Nach der stürmischen Entwicklung der Antibioticaforschung während der sogenannten "goldenen Ära" von 194o-196o wurde mit Beginn der 6Oer Jahre ein deutlicher Wandel auf diesem Gebiet erkennbar. Die grundsätzlichen therapeutischen Anforderungen waren erfüllt und die Zeit der schnellen und spektakulären Fortschritte vorbei (Kurylowicz 1976). Es wurde immer schwieriger, mit den herkömmlichen Verfahren von Waksman und anderen unter vergleichbarem Aufwand die erzielte Ausbeute an neuen Wirkstoffen auf einer vertretbaren Höhe zu halten. Somit mußten neue Wege erschlossen werden, um einerseits die Zahl der Doppelisolierungen möglichst klein zu halten und andererseits neue Anwendungsmöglichkeiten und damit Kriterien zur Aufspürung interessanter Substanzen an die Hand zu bekommen. Die Vielfalt chemischer Strukturen bei Sekundärmetaboliten geht einher mit der großen Vielfalt an pharmakologischen Aktivitäten und Zielstrukturen, die diese Klasse von Naturprodukten auszeichnet (Weinberg 197o). Geht man zusätzlich davon aus, daß die Anzahl der von Mikroorganismen innerhalb des Sekundärstoffwechsels synthetisierten Produkte keiner grundsätzlichen Beschränkung unterliegen sollte (Zähner 1978), so ergaben sich eine ganze Reihe möglicher, erfolgversprechender Schwerpunkte (Bérdy 1974), wie zum Beispiel vermehrte Einführung semisynthetischer Antibiotica, Suche nach neuen (auch nicht pharmakologischen) Anwendungsgebieten, neue Screeningmethoden und Suche nach ungewöhnlichen Antibioticaproduzenten, mikrobielle Steffumwandlungen (Kieslich 1978) und Mutasynthesen (Daum & Lemke 1979).

Unter den neuen Screeningmethoden hatte das Engspektrumkonzept bereits einige erfolgreiche Resultate erbracht, so zum Beispiel die Antibiotica Kirromycin (Wolf et al. 1972), Stenothricin (Hasenböhler et al. 1974), Tirandamycin (Santo 1976, Hagenmaier et al. 1976), Imacidin (Brecht-Fischer et al. 1979) und die Brevienomycine (Zitzmann 198o). Bei diesem Verfahren wird das Prinzip des klassischen Screenings durch

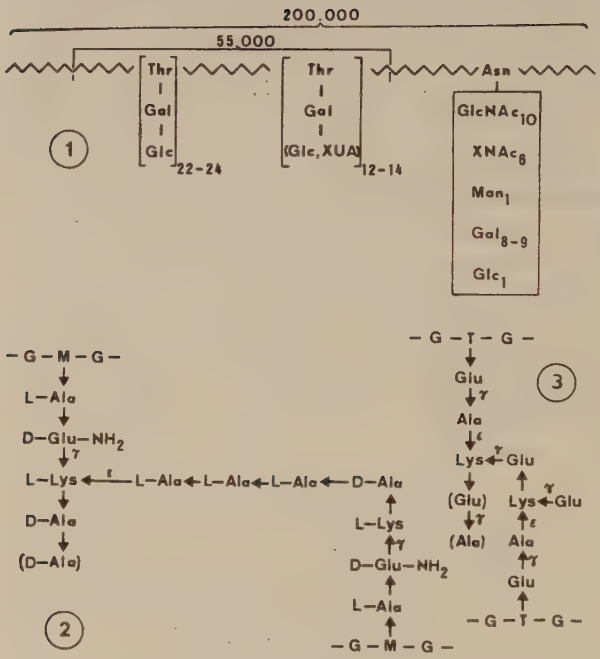
eine bestimmte Auswahl von Testorganismen dahingehend variiert, daß der Zusammenhang zwischen eingesetztem Testkeim und späterem Anwendungsbereich aufgegeben und nur die selektive Hemmwirkung auf einen einzigen, oftmals sehr speziellen und normalerweise im klassischen Screening nicht eingesetzten Teststamm verfolgt wird.

Ein solcher Organismus ist beispielsweise Halobacterium cutirubrum, der in die seit einigen Jahren systematisch neu begründete Gruppe der "Archaebakterien" einzuordnen ist (Woese et al. 1978). Neben den Halobakterien gehören noch die thermophilen Vertreter Sulfolobus und Thermoplasma sowie eine Reihe von methanogenen Organismen zu den Archaebakterien, die als ein dritter separater Entwicklungszweig den übrigen Prokaryonten und den Eukaryonten zur Seite gestellt werden. Unter dem Gesichtspunkt dieser Sonderstellung erschien es uns lohnend, Halobakterien als Testkeime im Antibioticascreening einzusetzen.

Neben ihrer halophilen Lebensweise in 25 % NaCl zeichnen sie sich durch den ungewöhnlichen Aufbau ihrer Zellwand aus. Bis vor kurzem wurde das Vorkommen eines Mureins oder auch Peptidoglycans als Bestandteil der Zellwand als charakteristisches und allgemein verbreitetes Merkmal aller Bakterien angesehen. Inzwischen hat man jedoch neben den zellwandlosen Mycoplasmen und einigen bakteriellen L-Formen andere Ausnahmen gefunden, bei denen zum Teil völlig abweichende Lösungen zur Stabilisierung der Zellform verwirklicht sind. Die sich diesbezüglich bereits abzeichnende Sonderstellung der oben aufgeführten halophilen, thermophilen und methanogenen Bakterien wurde von Woese und Fox (1977) durch Untersuchungen zur Homologie der 16 s rRNS einer ganzen Reihe von Prokaryonten untermauert. Die 16 s rRNS ist ein noch konservativerer Zellbestandteil als die DNS und damit besonders gut für die Untersuchung von Verwandtschaftsgraden geeignet, die sich auf sehr weit zurückliegende evolutionäre Entwicklungen gründen. Anhand solcher Analysen läßt sich ein Stammbaum erstellen, in dem die oben erwähnten halophilen, thermophilen und methanoge-

nen Organismen eine gesonderte Gruppe bilden, die die Autoren als Archaebakterien den übrigen Eubakterien gegenüberstellen (Woese & Fox1977a, 1977b; Stackebrandt & Woese 1979). Der Ast dieser Archaebakterien hat sich vermutlich bereits vor mehr als 3 Milliarden Jahren - eventuell gleichzeitig mit der Entwicklung der eukaryontischen Zellen - von den anderen Bakterien getrennt und kann als 3. selbständiger Entwicklungszweig angesehen werden. Das Murein der Eubakterien, sowie die Zellwände der Eukaryonten und der Archaebakterien sind dann offenbar erst im Anschluß oder gleichzeitig mit dieser Trennung "erfunden" worden. Eine ausführliche Diskussion der Verwandtschaftsverhältnisse und Kriterien der vorgenommenen Einteilungen findet sich bei: Magrum et al. 1978, Woese et al. 1978, Kwok & Wong 1979, Woese et al. 198o, Schleifer & Kandler 1972, Kandler 1979. Das sogenannte "Pseudomurein" der Methanbakterien hat trotz gravierender Unterschiede - wie zum Beispiel das Fehlen von D-Aminosäuren oder das Vorkommen von N-acetyltalosaminuronsäure anstelle von N-acetylmuraminsäure - doch zumindest noch den prinzipiellen Aufbau mit dem Murein gemeinsam: nämlich ein Glycanstrang mit angehefteten kleinen Peptiden, durch die eine dichte Quervernetzung ausgebildet wird. Das Glycoprotein der Halobakterien ist demgegenüber nach dem genau gegenteiligen Prinzip aufgebaut. Es besteht aus einem Proteinstrang, an den Zucker verschiedener Art gebunden sind, so daß auch hier eine Querbrückenbildung zur Stabilisierung der Zellform zustande kommen kann.

Die Darstellungen 1, 2 und 3 zeigen die beschriebenen drei Zellwandstrukturen im Vergleich (nach Mescher & Strominger 1978, Kandler 1979). Bei Halobacterium salinarium konnte man z.B. 15-2o Proteine in der Zellwand nachweisen. Etwa 5o % des Zellwandgesamtproteins liegt als ein solches hochmelokulares Glycoprotein vor, an das alle Aminozucker und alle nicht lipidgebundenen Hexosen der Zellwand kovalent gebunden sind. Dieses Glycoprotein hat ein Molekulargewicht von 22oooo D und enthält einen Kohlenhydratanteil von 1o-12 %. Es handelt sich hierbei um ein extrem saures



XUA = nicht identifizierte Hexuronsäure
XNAc = nicht identifiziertes Hexosamin
M = N-Acetylmuraminsäure
G = N-Acetylglucosamin
T = N-Acetyltalosaminuronsäure

1 = Glycoprotein von Halobacterium salinarium
2 = Murein von Streptococcus faecalis
3 = Pseudomurein von Methanob. thermoautotrophicum

Protein mit einem Gehalt von 33 mol% Aspartat und Glutamat gegenüber nur 4 mol% basischer Aminosäuren. Wie aus der Darstellung ersichtlich ist ein N-gebundenes Heterosaccharid enthalten, dazu noch 34-38 Di- und Trisaccharide, die über eine o-glycosidische Bindung zwischen Galaktose und Threo-

nin gebunden sind. Diese Art von Glycoprotein ähnelt in entscheidenden Punkten sehr stark dem von eukaryontischen Zellen:

a) in der Art der Protein-Kohlenhydrat-Bindung

b) in Zahl, Größe und Zusammensetzung der Kohlenhydrat-Einheiten

c) in deren einheitliche Beschränkung auf definierte Regionen des Proteins

Die Anheftung der querverbindenden Zuckerreste erfolgt auch bei den Halobakterien über das allgemein verbreitete Prinzip der Bindung an einen Polyisoprenoid-Carrier zum Transport der einzelnen Stücke durch die Membran. Dieser Vorgang wurde ja zuerst für die Murein- und Lipopolysaccharidsynthese beschrieben (Higashi et al. 1967, Wright et al. 1967), später dann auch für die Glycoproteinsynthese bei Eukaryonten (Behrends 1974, Lennarz 1975).

Daß dieser Mechanismus auch bei Halobakterien vorliegt, erklärt deren Sensitivität gegenüber Bacitracin als einzigem Zellwandantibioticum. Bacitracin wirkt ja bekanntlich auf die Regeneration des Lipidcarriers, indem es die Abspaltung von anorganischem Phasphat verhindert.

Eine ausführliche Darstellung der Struktur und Physiologie von Halobakterien findet sich bei Dundas 1977 und 1978, sowie Caplan und Ginzburg (eds.) 1978.

Die oben ausgeführten Besonderheiten erklären umfassend die Sonderstellung der Archaebakterien innerhalb der Gesamtheit aller Bakterien. Halobakterien sind nun einerseits diejenigen mit der am stärksten abweichenden Zellwand und dem wohl spezialisiertesten Stoffwechsel, andererseits aber auch die am einfachsten zu züchtenden Vertreter dieser Gruppe. Es erschien also sehr interessant, sie in ein Engspektrumscreening zusammen mit Bacillus subtilis, E. coli, Botrytis cinerea, Mucor hiemalis und Streptomyces viridochromogenes (Tü 57) einzusetzen. Durch die parallele Erstellung eines Sensitivitätsspektrums der Halobakterien gegenüber bekannten Antibiotica kann die Brauchbarkeit dieser

Organismen in einem solchen Programm, in dem nur auf diejenigen Aktivitäten geachtet wurde, die allein gegen Halobakterien wirksam waren, die anderen Testkeime jedoch nicht oder nur in Spuren hemmten, festgestellt werden.

Der Streptomycetenstamm Tü 2115 ging als stark positiv aus einem solchen Screening hervor. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung dieser Aktivität unter besonderer Berücksichtigung des angewendeten Screeningmodells.

Aufgrund ihrer chemischen Struktur und ihrer Wirkung gegen Halobakterien wurde die Verbindung Halochinon genannt.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Substanzen der Firma E. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Brenntag, Mühlheim/Ruhr	Niax Polyol LHT 67
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	Mannit D-Glucose
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Agar Bacto Nutrient Broth Bacto Trypton Casamino Acids (vitamin free) Micro Inoculum Broth Bacto Yeast Extract Bacto Malt Extract Bacto Nutrient Agar Bacto PPLO Serum Fraction
Johns, Manville, USA	Celit
Macherey, Nagel & Co, Düren	Kieselgel P/UV_{254} f.d. präparative Dünnschichtchromatographie Kieselgel 60 <0,08 mm/<200 mesh f.d. Säulenchromatographie
Merck AG, Darmstadt	Pepton, tryptisch verdaut D-Lactose Saccharose Stärke Glyzerin DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} Schichtdicke 0,2 mm

Oxoid Deutschland, Wesel	Fleischextrakt (Lab Lemco Powder)
Riedel De Haen AG, Seelze, Hannover	Oxalsäure Dihydrat zur Analyse
Roth, Karlsruhe	NaCl
Serva Feinbiochemica, Karlsruhe	Tween 8o Uridin-2-(3)-Phosphat (Uridylsäure) Adenosin-2-(3)-Phosphat (Adenylsäure)
Sigma Chemical Company, St.Louis, USA	DNA from Calf Thymus/ Type I
Schoenenberger, Magstadt/ Stuttgart	Sojamehl
Strothmann-Brennereien, Minden	Distiller soluble

Radiochemikalien:

Radiochemical Center, Amersham, Buckinghamshire, England	^{14}C-Thymidin	56 mCi/mMol
	^{14}C-Uracil	62 mCi/mMol
	^{14}C-Alanin	159 mCi/mMol

Antibiotica:

Die eingesetzten Antibiotica entstammten der Antibioticasammlung des Instituts für Mikrobiologie I der Universität Tübingen.

2. Nährmedien

Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf 1 l Leitungswasser. Lediglich für chemisch definierte Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet. Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, 2o Min. bei 12o°C sterilisiert.

Bei Verwendung als Flüssigmedium ist die entsprechende Menge an Agar wegzulassen.

Medium zur Produktion von Halochinon

(1)	Sojamehl	2o g
	Mannit	2o g
	pH 7,5	

Medien zur Anzucht der Testkeime und des Produzenten

(2) Hefe-Malz-Medium (neutralisiert)

Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	1o g
Glucose	4 g
Agar	2o g
pH 7,3	

(3) Malzagar

Malzextrakt	2o g
Agar	2o g

(4) Komplettmedium für Lactobacillus, Leuconostoc und Propionibacterium

Micro Inoculum Broth	37 g
Agar	18 g
pH 6,7	

(5) Komplettmedium für Clostridium pasteurianum

Fleischextrakt	3 g
Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Pepton	2o g
Glucose	5 g > getrennt sterilisieren
Ascorbinsäure	o,2 g > getrennt sterilisieren
Agar	15 g
pH 7,o	

(6) Komplettmedium für Streptococcus

Trypton	1o g
Hefeextrakt	5 g
K_2HPO_4	13,7 g
Glucose	11 g (getrennt sterilisieren)
Agar	2o g
pH 7,6	

(7) NB-Medium für Bakterien

Nutrient Broth	8 g
Agar	2o g
pH 6,8	

(8) Ox-Medium für Bakterien

Fleischextrakt	1o g
Pepton	1o g
NaCl	5 g
Agar	2o g
pH 7,2	

(9) Minimalmedium für B.subtilis

Glucose	8 g
Ammoniumtartrat	4 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 g
$CaCl_2$	o,2 g
$MnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1o mg
Ferrioxamin B	2o mg
Agar	15 g

(1o) Minimalmedium für E.coli K12

KH_2PO_4	3 g
K_2HPO_4	7 g
tri-Na-citrat$\cdot 2H_2O$	o,5 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	o,1 g	
$(NH_4)_2SO_4$	1 g	
Glucose	4 g	(getrennt sterilisieren)
Agar	15 g	

(11) Komplettmedium A für Halobakterien (ATCC)

NaCl	25o g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1o g	
KCL	5 g	
$CaCl_2$	o,2 g	
Hefeextrakt	1o g	
Trypton	2,5 g	(getrennt sterilisieren)
Agar	15 g	
pH 7,o		

(12) Komplettmedium B für Halobakterien (Seghal & Gibbons, 196o)

NaCl	25o g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2o g	
KCL	2 g	
tri-Na-citrat$\cdot 2H_2O$	3 g	
$FeCl_2$	23 mg	
Hefeextrakt	1o g	
casamino acids	7,5 g	(getrennt sterilisieren)
Agar	15 g	
pH 6,2		

(13) Komplettmedium C für Halobakterien (Steensland & Larsen, 1968)

NaCl	25o g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1o g	
KCL	5 g	
$CaCl_2$	o,2 g	
Trypton	5 g	
Hefeextrakt	1oo g	(getrennt sterilisieren)
Agar	15 g	
pH 7,o		

(14) Minimalmedium für Halobakterien (Onishi et al.,1965)

DL-Alanin	o,43 g	NH_4Cl	5 g
L-Arginin	o,4 g	Glyzerin	1 g
L-Glutamat	1,3 g	NaCl	25o g
L-Cystin	o,o5 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2o g
Glycin	o,o6 g	KNO_3	o,1 g
DL-Isoleucin	o,44 g	tri-Na-citrat$\cdot 2H_2O$	o,5 g
L-Leucin	o,8 g	K_2HPO_4	o,o5 g
L-Lysin	o,85 g	KH_2PO_4	o,o5 g
DL-Methionin	o,37 g	$FeCl_2$	2,3 mg
DL-Phenylalanin	o,26 g	$CaCl_2 \cdot 7H_2O$	7,o mg
L-Prolin	o,o5 g	$MnSO_4 \cdot H_2O$	o,3 mg
DL-Serin	o,61 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	o,44 mg
DL-Threonin	o,5 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	o,o5 mg
L-Tyrosin	o,2 g	Agar	15 g
DL-Valin	1,o g	pH 6,2	
Adenylsäure	o,1 g		
Uridylsäure	o,1 g		

(15) Medium für Mycoplasma
PPLO-Serum (Fertigpräparat)

Zusätze zur Optimierung der Halochinonproduktion:

Vitaminlösung (nach Eikhom et al., 1963):

$CaCl_2$	1o mg
Thiamindichlorid	o,34 mg
Riboflavin	o,o38 mg
Ca-Pantothenat	o,48 mg
Pyridoxalphosphat	o,19 mg
Nicotinsäureamid	o,24 mg
Folsäure	o,44 mg
Biotin	o,24 mg
Vitamin B 12	o,o1 mg

8 min bei 120°C sterilisiert

Spurenelementlösung (= A-Z-Lösung nach Hoagland, 1932 u. 1933):

H_3BO_3	11 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7 g
$CuSO_4$	1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	1 g
$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	1 g
$Co(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	1 g
TiO_2	1 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1 g
LiCl	o,5 g
$SnCl_2$	o,5 g
KJ	o,5 g
KBr	o,5 g

entionis. Wasser 18 l

3. Testorganismen

3.1. Bakterien

	Kulturbedingungen Temp.	Medium
Achromobacter geminiani - Göttingen	27°	(2)
Arthrobacter aurescens (Clark) Phillips, -ATCC 13344	27°	(2)
Arthrobacter crystallopoietes Ensign et Rittenberg - ATCC 15481	27°	(7)
Arthrobacter globiformis (Conn) Conn et Dimmick - ATCC 8o1o	27°	(2)

	Kulturbedingungen	
	Temp.	Medium
Arthrobacter oxydans Sguros - ATCC 14358	27°	(2)
Arthrobacter pascens Lochhead et Burton - ATCC 13346	27°	(2)
Arthrobacter citreus Sacks -ATCC 11624	27°	(2)
Alcaligenes faecalis Castellani et Chalmers -DSM 3oo3o	30°	(7)
Bacillus brevis Migula -ATCC 9999	37°	(2,7)
Bacillus subtilis Cohn -ATCC 6o51	37°	(2,7,9)
Brevibacterium flavum Ajinomoto Co. -ATCC 14o67	27°	(2,7)
Brevibacterium linens (Weigmann) Breed -ATCC 9172	27°	(2)
Brevibacterium sterolicum Kyowa Ferm. Ind.Co. -ATCC 21387	27°	(2)
Clostridium pasteurianum Winogradsky -ATCC 6o13	30°	(5)
Corynebacterium poinsettiae Starr et Pirone -ATCC 9682	27°	(7)
Corynebacterium rathayi (Smith) Dowson -ATCC 13659	27°	(7,8)
Escherichia coli K 12 (Migula) Castellani et Chalmers W 1485, Köln	37°	(7,8,1o)
Halobacterium cutirubrum (Lochhead) Elazari-Volcani DSM 669	37°	(11-14)
Halobacterium halobium (Petter) Elazari-Volcani DSM 67o u. DSM 671	37°	(11-14)
Halobacterium salinarium (Harrison and Kennedy) Elazari-Volcani -DSM 668	37°	(11-14)

	Kulturbedingungen	
	Temp.	Medium
Lactobacillus brevis Bergey et al. -DSM 2oo54	30°	(4)
Lactobacillus casei (Orla-Jensen) Holland -ATCC 7469	37°	(4)
Leuconostoc mesenteroides P-6o (Cienkowski) van Tieghem -ATCC 8o42	37°	(4)
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn -ATCC 398	27°	(2,7,8)
Mycobacterium spec. -Tü 2o6	27°	(7)
Nocardia brasiliensis (Lindenberg) Pinoy -Tü 69	27°	(2)
Proteus mirabilis Hauser -Darmstadt	37°	(2,8)
Proteus vulgaris Hauser -NCTC 4157	37°	(7)
Propionobacterium freudenreichii Dr.Sahm, Stöckheim	37°	(4,5)
Pseudomonas fluorescens Migula -ATCC 11172 (Tü 921)	27°	(2,8)
Salmonella thyphimurium LT2 (Löffler) Castellani and Chalmers -Stocker, Standford, University of California	37°	(7)
Staphylococcus aureus Rosenbach -ETH 2o7o (Tü 2o2)	37°	(8)
Streptococcus faecalis Harold -NJH, Denver, USA	37°	(6)
Streptomyces glaucescens (Gause et al.) Hütter -Tü 49	27°	(2)
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksmann et Henrici -Tü 57	27°	(2)
Mycoplasma gallisepticum Thomae, Biberach - ATCC 153o2	37°	(15)

	Kulturbedingungen Temp.	Medium
Mycoplasma hominis Thomae, Biberach -ATCC 15488	37°	(15)
Mycoplasma leidlawii Thomae, Biberach -ATCC 23206	37°	(15)
Mycoplasma pneumoniae Thomae, Biberach -FH	37°	(15)
Mycoplasma pulmonis Thomae, Biberach -BC 67	37°	(15)
Ureaplasma Thomae, Biberach -960	37°	(15)

3.2. Hefen und Pilze

Aspergillus niger van Tieghem -Tü 503	37°	(2)
Aspergillus versicolor -ETH 3636 (Tü 149)	37°	(2)
Botrytis cinerea Peerson et Fries -Tü 157	27°	(3)
Cancida albicans (Robin) Berkhout -Tü 164	27°	(2)
Endomyces magnusii Ludwig -Tü 167	27°	(2)
Hansenula anomala Hansen and Sydow -Tü 279	27°	(2)
Mucor hiemalis (+) Wehmer -Tü 179	27°	(2)
Mucor hiemalis (-) Wehmer -Tü 180	27°	(2)
Mucor mihei Cooney and Emerson -Tü 284 (ETH M 52)	37°	(2)
Paecilomyces varioti Bainier -Tü 137 (ETH M 4646)	37°	(2)
Penicillium chrysogenum Thom -Tü 151 (ETH 4360)	27°	(2)
Pichia farinosa (Lindner) Hansen -Tü 291	27°	(2)

	Kulturbedingungen	
	Temp.	Medium
Rhodotorula ruber -spez.Botanik, Tübingen	27°	(2)
Saccharomyces cerevisiae Hansen -Tü 125 (ETH M 1o8)	27°	(2)
Trichophyton spec. -Tü 16o	27°	(2)
Ustilago maydis (Beckmann) Unger -Tü 567	27°	(3)

4. Methoden zur Untersuchung von Halobakterien als Screeningorganismen

4.1. Wachstumsversuche

Die Halobakterienkulturen wurden wie folgt hergestellt:

Nach Inkubation einer Vorkultur für 48 h im jeweiligen Testmedium wurden diese 1o min bei 3ooo rpm zentrifugiert, 1 x mit 25 % NaCl gewaschen, erneut zentrifugiert und mit 25 % NaCl auf eine OD_{578} von o,25 eingestellt.

1 ml dieser Suspension wurde zum Animpfen von 5o ml Testmedium verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Schüttelwasserbad unter fortlaufender Extinktionsmessung bzw. Probenahme.

4.2. Herstellung von Testplatten

Für Halobakterien-Testplatten wurden 2,5 ml einer bis zur OD_{578} = 1,o gewachsenen Vorkultur zu 1oo ml Komplettmedium (11) gegeben und in Petrischalen zu 17,5 ml ausgegossen. Die Schichtdicke muß entsprechend hoch gewählt werden, weil sonst die Platten während der langen Inkubationszeit von 3 Tagen zu sehr austrocknen und das NaCl auskristallisiert. Für B.subtilis und B.brevis wurden Sporensuspensionen hergestellt und mit H_2O dest. auf eine OD_{578} von 1,o eingestellt. Für Komplettmedium wurden o,5 ml/1oo ml und für

Minimalmedium 1,o ml/1oo ml eingesetzt und in Platten zu je 1o ml gegossen. Von E.coli und Staphylococcus aureus wurden Vorkulturen bis zu einer OD_{578} von 1,o bzw. 1,3 angezogen. Die Einsaatdichte für E.coli gilt entsprechend wie für Bacillus; für Staph.aureus wurden Platten mit 2 ml Suspension pro 1oo ml Medium gegossen.

Clostridium pasteurianum wurde in Reagenzgläsern in Flüssigkultur bei 24°C gezogen und täglich mit 1-3 ml überimpft. 3 ml einer solchen Kultur wurden zu 1oo ml festem Medium gegeben, zu 1o ml-Platten gegossen und im Anaerobiertopf (+1 Gas Pak, Anaerobier System BBL) bei 3o°C inkubiert.

Für Paecilomyces und Streptomyces wurden 4 ml Sporensuspension zu 1oo ml Medium gegeben und in Platten zu 17,5 ml ausgegossen. Bei Botrytis cinerea wurden 2,5 ml, bei Mucor mihei o,2 ml und bei Mucor hiemalis 5 ml Sporensuspension entsprechend eingesetzt.

4.3. Tests zur Identifizierung von Ausscheidungsprodukten

Antagonismustest mit Isoleucin:

a) Testplatten mit zusätzlich zum Medium eingegossenem Isoleucin (1 mM und 5 mM) wurden parallel zu Testplatten ohne Isoleucin inkubiert. Bei Vorliegen eines Antagonismus sollte die entsprechende Probe auf den Platten mit Isoleucin keine Wirkung mehr zeigen.

b) Kreuztest mit 1 mM und 5 mM Isoleucin (nach Zähner & Maas 1972) und der entsprechenden aktiven Probe.

Dünnschicht-Chromatographie (nach Stahl, 1967) mit anschließendem Bioautogramm (nach Kirst, 1971):

Laufmittel: 6o ml Äthanol
15 ml Eisessig
15 ml H_2O

Kulturprobe und Vergleichslösung (Valin) wurden nebeneinander an Kieselgel DC-Alufolien chromatographiert. Eine

Plattenhälfte wurde sodann mit Sprühreagenz angefärbt, um die Substanzen zu lokalisieren; die andere Plattenhälfte wurde in Streifen zu o,5 cm geschnitten und als Bioautogramm auf Testplatten ausgelegt. Bei einem Vergleich der aktiven Streifen und der entsprechenden R_f-Werte kann eine Zuordnung der Substanzen getroffen werden.

5. Fermentation von Halochinon

5.1. Herstellung von Halochinon im 5oo ml Schüttelkolben

Erlenmeyerkolben mit 5oo ml Volumen und 1 seitlichen Einstich wurden mit 1oo ml Produktionsmedium (1) gefüllt, 2o min bei 120°C sterilisiert und mit je einem Stückchen Zellmaterial vom Schrägröhrchen beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine mit 12o rpm. Nach etwa 6o h zeigte eine Rosafärbung, die im weiteren Fermentationsverlauf in ein intensives Rot-Schwarz überging, den Beginn der Halochinonproduktion an. Nach 7o-8o h war die biologische Aktivität erstmals im Plattendiffusionstest gegen Halobakterien nachweisbar und erreichte unter kontinuierlichem Anstieg ein Maximum nach 14-16 Tagen. Über einen beobachteten Zeitraum von weiteren 14 Tagen fiel die Produktion danach wieder langsam ab, ohne daß jedoch eine Lyse der Kultur festzustellen war.

5.2. Herstellung von Halochinon im Fermenter

5.2.1. Bereitung des Impfmaterials

Kolleschalen mit 7o ml festem Hefe-Malz-Medium (2) wurden mit 2,5 ml einer vom Schrägröhrchen abgeschwemmten Sporensuspension beimpft und 2 Wochen bei 27°C bis zur guten Ausbildung des Luftmyzels und Sporulation inkubiert. Pro Kolleschale wurden 1oo ml entionisiertes H_2O, dem 2 Tropfen

Tween 8o zugesetzt waren, eingefüllt und die Sporen vorsichtig abgelöst. Die so gewonnene Sporensuspension wurde über Glaswolle filtriert und direkt als frisches Impfmaterial für eine Fermentation verwendet.

5.2.2. 1o l-Fermentation

Fermenter mit 1o l Nutzinhalt (Modell MF 14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) wurden mit 1o l Produktionsmedium (1) gefüllt, 3o min bei 134°C sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 1oo ml Sporensuspension von einer Kolleschale beimpft. Die Fermentation erfolgte dann bei 27° C, 2,5 l Luftzufuhr pro min und 2oo rpm des Rührwerkes. Das Produktionsmaximum war in der Regel nach 14 Tagen erreicht. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wurde dem Medium bereits vor der Sterilisation 1 ml Polyol zugesetzt; im Verlauf der Fermentation mußte diese Menge je nach Bedarf auf 2-4 ml erhöht werden.

5.2.3. 25 l-Fermentation

Ein Fermenter der Firma Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz (Modell 1976) wurde mit 25 l Produktionsmedium (1) und Zusatz von 3 ml Polyol in situ bei 12o°C für 3o min sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde mit 2oo ml frischer Sporensuspension von 2 Kolleschalen beimpft und bei 27°C, 6 l Luftzufuhr pro min und 75o rpm im Umwurfsystem inkubiert. Das Produktionsmaximum war nach 1o-11 Tagen erreicht; in der Regel wurde die Fermentation nach 1o Tagen beendet.

5.3. Kontrolle des Fermentationsverlaufs

Während einer Fermentation wurden täglich Proben genommen und wie folgt ausgewertet:

1. Bestimmung des pH-Wertes in der Kulturflüssigkeit.
2. Bestimmung des Myzelvolumens als % Sediment nach Zentri-

fugation in graduierten Zentrifugengläsern (1o min, 3ooo rpm).

3. Bestimmung der antibiotischen Aktivität in der Kultur durch einen Plattendiffusionstest mit Halobacterium cutirubrum.

6. Aufarbeitung und Reinigung von Halochinon

6.1. Gewinnung des Myzels

Nach Erreichen des Produktionsmaximums wird die Kulturbrühe mit HCL auf pH 4,5 angesäuert, mit 2 % Celit (Filterhilfsmittel) versetzt und mit einer Mehrschichtenfilterpresse unter Einsatz von C-15o Filterschichten (Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) abgepreßt. Das klare Kulturfiltrat enthält keine Aktivität und wird verworfen, während das Myzel weiter aufgearbeitet wird.

6.2. Reinigung bis zum Farbstoffrohprodukt

Das Myzel wird mehrmals mit 1/1o Volumen Methanol extrahiert, wobei die anfänglich dunkelrote Farbe des Extraktes durch abnehmende Intensität erschöpfende Extraktion des Antibioticums anzeigt. Nach Konzentration im Vakuum wird der wässrig-ölige Rückstand mit Chloroform ausgeschüttelt und alle hierin nicht löslichen Bestandteile abgetrennt. Anschließend wird der Chloroformextrakt zunächst mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und dann mit 5 %iger Natriumcarbonatlösung ausgezogen. Bei diesem Schritt, der einen pH-Wert Anstieg auf 11,6 beinhaltet, schlägt das unter sauren und neutralen Bedingungen rote und lipophile Halochinon unter Übertritt in die wässrige Phase nach blau um. Hierdurch wird eine recht gute Trennung von den übrigen lipophilen Bestandteilen des Chloroformextraktes erreicht. Ansäuern der blauen Sodalösung unter Ausfall des wieder nach rot umschlagenden Halochinons und die folgende Reex-

traktion mit Chloroform liefert sodann ein Farbstoffrohprodukt, das über Kieselgel weiter getrennt wird.

6.3. Chromatographie an Kieselgel

6.3.1. Oxalsaures Kieselgel zur Säulenchromatographie

Zur Herstellung dieses zur Trennung notwendigen Kieselgels werden 1 kg KG 60 mit 2 l einer 0,5 n Oxalsäurelösung in einer großen Glasschale verrührt und 24 h bei 110°C getrocknet. Anschließend wird das oxalsaure Kieselgel fein gesiebt, nochmals für 2 h bei 110°C aktiviert und kann dann in eine Säule eingefüllt werden.

Nach Aufschlämmen in Chloroform und Absitzen der Kieselgelfüllung in der Säule erfolgt die Chromatographie ebenfalls in Chloroform unter mittlerer Durchflußgeschwindigkeit. Das Halochinon kann aus der tiefroten Hauptzone isoliert und nach Umfällung in n-Pentan als Reinsubstanz erhalten werden.

6.3.2. Präparative Schichtchromatographie an Weinsäure-Kieselgel

Zur Trennung kleinerer Mengen an Halochinon wurden präparative Platten benutzt. Hier hat es sich als günstiger herausgestellt, das Kieselgel nur mit einer 0,35 n Oxalsäurelösung oder mit 0,25 n Weinsäure zu imprägnieren (bei höheren Konzentrationen kristallisiert die Säure auf der Platte aus).

In der Regel wurde der Einsatz von Weinsäure bevorzugt.

Zur Herstellung der Platten werden 50 g Kieselgel P/UV_{254} in 125 ml Weinsäurelösung aufgeschlämmt und als gleichmäßige Schicht auf eine Glasplatte von 20 x 40 cm Fläche ausgegossen. Nach 36-stündigem Trocknen bei Raumtemperatur wird die Platte 3 h bei 110°C aktiviert und dann zur Trennung benutzt.

Die entsprechende Substanz wird in 2 cm Höhe vom unteren Rand als 25-30 cm langer und möglichst schmaler Streifen

gleichmäßig aufgetragen und in Chloroform entwickelt. Nach Beendigung der Trennung wird die tiefrote Halochinonbande sorgfältig ausgekratzt, in Chloroform aufgenommen und durch Filtration mit Glaswolle vom Kieselgel befreit. Durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem H_2O wird das restliche Kieselgel sowie überschüssige Säure entfernt. Der Extrakt wird sodann über Natriumsulfat getrocknet, so weit wie möglich konzentriert und in n-Pentan umgefällt.

Dieser Vorgang liefert ebenfalls ein einheitliches reines Halochinon.

6.4. Reinheitskontrolle mit Dünnschichtchromatographie

Zur Überprüfung der einzelnen Reinigungsschritte während der Aufarbeitung, und zur Kontrolle von Extraktionsproben wurde eine Chromatographie in Chloroform an weinsäurebehandelten Kieselgel DC-Alufolien durchgeführt (nach Stahl, 1967). Die Folien werden in eine o,25 n Weinsäurelösung getaucht, bei Raumtemperatur getrocknet und vor Gebrauch für 1o min bei 11o°C aktiviert.

Im Anschluß an die Chromatographie erfolgte die Lokalisierung des Antibioticums bzw. der Verunreinigungen durch Bioautographie, Fluoreszenzlöschung im UV-Licht sowie Anfärben durch Besprühen mit Vanillin-H_2SO_4 und 5 min Erhitzen bei 12o°C.

6.5. Bestimmung der Halochinonausbeute bei verschiedenen Extraktionsschritten

Jeweils 1oo ml Kulturprobe wurden wie folgt behandelt:

1) Extraktion mit 1oo ml des jeweiligen Extraktionsmittels
2) Einengen des Extraktes bis zur Trocknung und Aufnahme in 5o ml Chloroform
3) a) Chromatographie von 1o µl dieser Lösung an mit Weinsäure imprägnierten Kieselgel DC-Alufolien in Chloroform

b) Vergleichschromatographie einer Reihe von 4-5 Eichlösungen Halochinon

4) Detektion des Halochinonflecks auf der Platte und Messung der Intensität anhand des UV-Maximums von Halochinon bei 287 nm mit einem TLC/HPTLC-Scanner der Firma Camag, Muttenz/Schweiz.

5) Zuordnung der Substanzmenge in der Extraktionsprobe über die mitgemessene Eichkurve.

7. Physikalische und chemische Charakterisierung von Halochinon

Die Charakterisierung und Strukturaufklärung des Halochinons übernahm Herr Dr. B Krone, Organisch-Chemisches-Institut der Universität Göttingen.

8. Biologische Charakterisierung von Halochinon

8.1. Plattendiffusionstest

Zur Aufnahme des antibakteriellen und antifungischen Wirkungsspektrums, sowie zur Kontrolle bei Fermentation und Aufarbeitung von Halochinon wurde ein Plattendiffusionstest, wie bei Zähner & Maas (1972) beschrieben, durchgeführt.

Für die Herstellung der Pilzplatten wurde von einem etwa 14 Tage inkubierten Schrägröhrchen mit 5 ml Saline eine Sporensuspension abgeschwemmt. o,1 ml dieser Suspension wurden zu 1oo ml Nährboden zugegeben und die Platten zu je 17,5 ml gegossen. Für Halobakterienplatten gelten die unter II.4.2. beschriebenen Bedingungen.

Von allen anderen Testkeimen wurden Vorkulturen im jeweiligen Testmedium angezogen, 1 x auf frisches Medium überimpft und bis zu einer OD_{578} von 1 weiterinkubiert. 1oo ml Nährboden wurden sodann mit 1 ml dieser Kultur beimpft und

auf Platten zu je 1o ml ausgegossen.

Bei der Testdurchführung wurden in der Regel die Filterrondellen in die zu testende Lösung eingetaucht und auf standardisiertem Filterpapier getrocknet. Lediglich für die Aufnahme von Eichkurven bei Halochinon wurden pro Rondelle exakt 1o µl Lösung aufgetragen und auf einer Glasplatte getrocknet.

Bei Halobakterien konnten die Hemmhöfe erst nach 3 Tagen Inkubation genau abgelesen werden, bei allen anderen Testkeimen wurde 2o h inkubiert.

8.2. Verdünnungsreihentest

Die in Tabelle 6 angegebenen minimalen Hemmkonzentrationen wurden anhand eines Verdünnungsreihentests in Komplettmedium bestimmt (variiert nach Kavanagh 1963).

Die Testorganismen wurden in der entsprechenden Nährlösung über Nacht inkubiert, dann auf frisches Medium überimpft und für weitere 2-4 h gezüchtet. Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden sodann auf eine OD_{578} von o,o1 eingestellt und 1 ml dieser Suspension in den Test eingesetzt.

Die zu testenden Antibioticakonzentrationen wurden wie folgt vorbereitet: 2 mg Halochinon wurden in 15o-2oo µl o,5 n NaOH weitgehend gelöst. Es wurde dann soweit Medium zugegeben, bis alles Halochinon gelöst war und auf eine Endkonzentration von 2oo µg/ml aufgefüllt. In Verdünnungen von 1:1o, 1:1oo und 1:1ooo wurden die Konzentrationen von 2o µg/ml, 2 µg/ml und o,2 µg/ml hergestellt. Die durch die NaOH hervorgerufene pH-Veränderung belief sich je nach Medium und Verdünnungsstufe auf maximal o,7 Einheiten.

Für eine Verdünnungsreihe mit einem Testorganismus wurden 1 ml vorher eingestellter Bakteriensuspension und 1 ml Medium mit der entsprechenden Halochinonkonzentration zusammengegeben und im Wasserbad bei den entsprechenden Temperaturen unter oszillierender Bewegung inkubiert. Die Auswertung erfolgte in der Regel nach 18 h, bei Halobakterien

nach 2-3 Tagen. Dabei wurde diejenige Antibioticumkonzentration als MHK angegeben, bei der mit bloßem Auge keine Trübung gegen einen dunklen Hintergrund festzustellen war. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt; als Kontrolle diente eine Kultur ohne Antibioticum.

Bakterizidie wurde durch Ausstriche aus klar gebliebenen Röhrchen auf Agarplatten bestimmt.

8.3. Versuche mit dem Biophotometer

Zur Untersuchung der Halochinonwirkung während verschiedener Wachstumsphasen wurde mit dem Testkeim Halobacterium cutirubrum in einem Biophotometer (Biophotometre Bonet-Maury, Jobin Yvon, Division d'Instruments S.A.) eine automatische Wachstumsregistrierung in Flüssigmedium durchgeführt.

Pro Küvette wurden 6 ml einer auf die OD_{578} von o,1 eingestellten Vorkultur gegeben, die sich in einer der unter III.6.2. angegebenen Wachstumsphasen befand. Je 2o µl einer methanolischen Halochinonlösung definierter Konzentration wurden sofort zugesetzt und die Transmission für alle Kulturen am Gerät auf 9o % eingestellt. Als Kontrollen dienten Kulturen ohne Zusatz bzw. 2o µl Methanolzusatz als Lösungsmittelkontrolle. Die Inkubation erfolgte über mehrere Tage bei 37°C und maximaler Einstellung des Magnetrührwerks und des Schüttlers.

8.4. Einbau radioaktiv markierter Bausteine der Protein-, RNS- und DNS-Synthese

Die Versuche wurden mit Halobacterium cutirubrum bei 37°C in chemisch definierter Nährlösung (14) durchgeführt. Aufgrund der extrem langen Generationszeit dieser Organismen von 6-8 h mußten die Probenahmen über einen mindestens ebenso langen Zeitraum erfolgen, um den Einbau einer ausreichenden Menge an Material zu gewährleisten. Eine 72 h alte Vorkultur wurde auf eine OD_{578} von o,25 eingestellt

und zu je 7 ml auf drei Erlenmeyerkölbchen mit 25 ml Volumen und 1 seitlichen Einstich verteilt. Zu jeder Kultur wurde sodann 1 µCi der entsprechenden, ^{14}C-markierten Vorstufe gegeben und sofort eine Probe entnommen. Nach 1o min Inkubation wurde die zweite Probe genommen und gleich darauf das Antibioticum in einer Endkonzentration von 1 µg/ml in methanolischer Lösung zugesetzt. Als Kontrolle diente eine Kultur, der reines Methanol zugegeben wurde; Vergleichsantibiotica zur Überprüfung der Hemmung der entsprechenden Synthese wurden ebenfalls mitgetestet.

Nach weiteren 1o min Inkubation erfolgte die dritte Probenahme; danach wurden die Intervalle allmählich bis zu Abständen von 8o min verlängert.

Die entnommenen 2oo µl Probe wurden in vorbereitete Gläschen mit 2 ml eiskalter 5 %iger Trichloressigsäure pipettiert und 2 h im Eis stehen gelassen. Danach wurden die gefällten Proben über Membranfilter von 25 mm Durchmesser und o,45 nm Porengröße (Sartorium-Membranfilter GmbH, Göttingen) abgesaugt, 2 x mit je 5 ml 5 %iger Trichloressigsäure gewaschen und über Nacht getrocknet. Die Filter wurden sodann in Plastikgläschen gegeben, je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g PPO/1 l Toluol) zupipettiert und im Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer (Mark II, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA) die in das säurefällbare Material eingebaute Radioaktivität als cpm gemessen.

8.5. Messung der Verschiebung im Absorptionsspektrum von Halochinon nach Inkubation mit DNS

Der Versuch wurde für das Absorptionsmaximum von Halochinon im sichtbaren Wellenlängenbereich bei 512 nm durchgeführt. Der Ansatz wurde nach der Darstellung bei Swanbeck (1966) variiert.

Pufferstammlösung: $o,75 \cdot 10^{-3}$ M Na_2HPO_4

$o,25 \cdot 10^{-3}$ M NaH_2PO_4

Antibioticumlösung: 2 mg Halochinon/4 ml alkalisches Äthanol

Ansatz A:
10 mg Kalbsthymus-DNS
10 ml Puffer
500 µl Halochinonlösung

Ansatz B:
10 ml Puffer
500 µl Halochinonlösung

Über einen Bereich von 450 bis 650 nm Wellenlänge wurde der Absorptionsverlauf beider Ansätze in Schritten zu 5-10 nm mit einem Spektralphotometer (Carl Zeiss, Oberkochem - Modell PM Q II) gegen Puffer gemessen.

Die Messung wurde einmal sofort durchgeführt und dann nach 18 h Inkubation bei Raumtemperatur nochmals wiederholt, was allerdings keine Veränderung in der Lage des Maximums gegenüber der zuerst aufgenommenen Kurve ergab.

III. ERGEBNISSE

1. Verwendungsmöglichkeiten von Halobakterien bei der Suche nach neuen Antibiotica

1.1. Wachstum und Hemmstoffproduktion bei Halobakterien

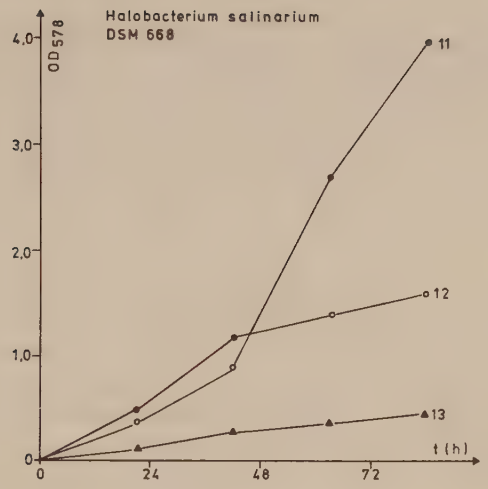
Zunächst wurde das Wachstum von 4 Halobakterienstämmen auf drei verschiedenen komplexen Nährlösungen überprüft. Wie in Abbildung 1 dargestellt, erwies sich dabei das Medium Nr. 11 als das günstigste und wurde bei den meisten folgenden Versuchen als Medium für Halobakterienvorkulturen eingesetzt. Zur Feststellung einer eventuellen Hemmstoffproduktion wurden die vier zur Verfügung stehenden Halobakterienstämme auf den drei komplexen Nährlösungen Nr. 11, 12 und 13 bei 37°C und guter Belüftung inkubiert, über jeweils 6 Tage hinweg Proben entnommen und im Plattendiffusionstest auf antibiotische Aktivität gegen eine Reihe von Testkeimen geprüft. Vereinzelt trat dabei eine geringe Aktivität gegen Mucor, Clostridium pasteurianum oder einen Streptomycetenstamm auf, jedoch nur über einen sehr kurzen Zeitraum (24 h) und bei Wiederholung des Versuchs nicht oder nur teilweise reproduzierbar.

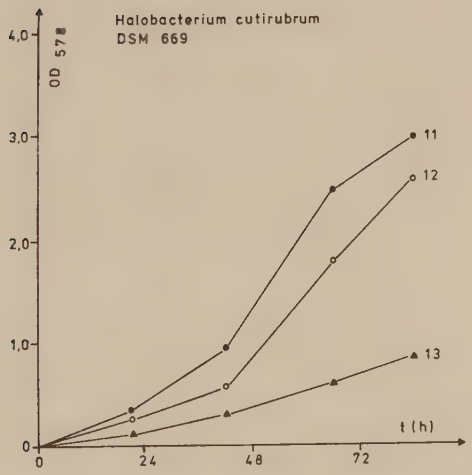
Eine starke Wirkung von 4o mm Hemmhofdurchmesser auf synthetischem Medium gegen E.coli K 12 war auf Komplexmedium nur noch in Spuren nachweisbar und ließ sich durch Zugabe von 1 mM Isoleucin zum Minimalmedium und durch einen Kreuztest mit Isoleucin antagonisieren. Damit lag die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem Stoffwechselprodukt der Halobakterien um die Aminosäure Valin handelt. Durch eine vergleichende Dünnschichtchromatographie sowie anschließendem Bioautogramm ließ sich dieser Schluß bestätigen.

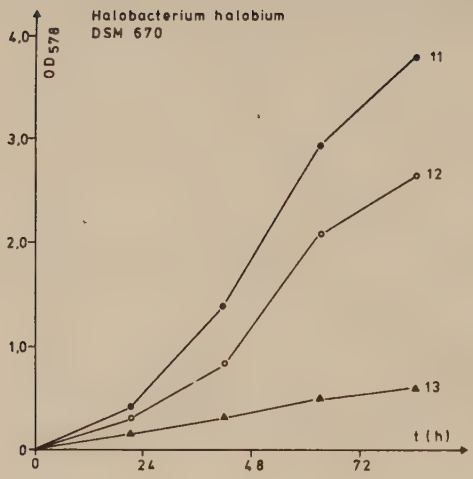
Unter den dargestellten Versuchsbedingungen war diese Valinausscheidung die einzige Stoffwechselleistung, der

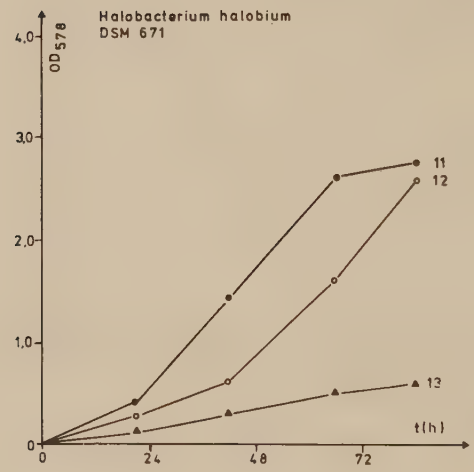
eine Hemmwirkung auf Testorganismen eindeutig zugeordnet werden konnte. Darüberhinaus ließ sich die Produktion einer antibiotisch wirkenden Substanz bei Halobakterien nicht nachweisen.

Abb. 1: Wachstumsverlauf der vier Halobakterien-Teststämme in den komplexen Nährlösungen Nr. 11, 12 und 13.


Halobacterium salinarium
DSM 668
OD 578
4,0
3,0
2,0
1,0
0
0
24
48
72
t (h)
11
12
13


Halobacterium cutirubrum
DSM 669
OD 578
4,0
3,0
2,0
1,0
0
0
24
48
72
t (h)
11
12
13


Halobacterium halobium
DSM 670
OD578
4,0
3,0
2,0
1,0
0
0
24
48
72
t (h)
11
12
13


Halobacterium halobium
DSM 671
OD578
4,0
3,0
2,0
1,0
0
0
24
48
72
t(h)
11
12
13

1.2. Antibioticasensitivität von Halobakterien

Um den Aussagewert von Ergebnissen mit Halobakterien im Antibioticascreening zu ermitteln, wurden diese Organismen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer großen Zahl bekannter Hemmstoffe im Plattendiffusionstest auf komplexem Nährboden geprüft. Die eingesetzten Antibioticakonzentrationen betrugen o,1 und 1 mg/ml; als Vergleichsorganismus diente Bacillus subtilis.
Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieses Tests.
Auffällig ist die allgemein sehr geringe Sensitivität der Halobakterien gegenüber Antibiotica. Über 7o % der getesteten Substanzen zeigte keine oder nur Spuren einer Hemmung. Mit Hemmhofdurchmessern zwischen 12 und 2o mm waren weitere 5 Antibiotica (Boromycin, Ethericin A, Cerulenin, Tetracenomycin C und Aranciamycin) mäßig aktiv und mit 2o-3o mm Hemmzone Cinerubin A, Rifampicin und Avilamycin gut aktiv. Als ausgesprochen stark wirksam erwiesen sich lediglich Bacitracin, Mitomycin C und Granaticin A.

Die gute Hemmwirkung von Bacitracin läßt sich hierbei durch den Angriffsort am Polyisoprenoid-Carrier erklären, über den auch bei Halobakterien die Verknüpfung der Zuckerreste mit dem Proteinanteil bei der Zellwandsynthese erfolgt (Mescher & Strominger 1975 und 1978). Mitomycin und Granaticin greifen beide in den Nucleinsäurestoffwechsel ein und gehören strukturmäßig in die Gruppe der Chinone.

Tabelle 1: Vergleich der Wirkung verschiedener Antibiotica auf Bacillus subtilis und Halobakterien im Plattendiffusionstest mit Komplexmedium

Antibioticum (o,1 und 1,o mg/ml)	Hemmhofdurchmesser in mm							
	B.subtilis		H.cutirubrum		H.halobium		H.salinarium	
	o,1	1,o	o,1	1,o	o,1	1,o	o,1	1,o
Actinomycin D	24	24/3o	-	1o	-	9	-	Spur
Alanyl-amino-aethyl-Phosphonsäure	-	-	-	-	-	-	-	Spur
Albomycin	13	16	-	-	-	-	-	-
Antimycin A	-	-	-	-	-	Spur	-	-
Aranciamycin	13	18	9	13	n.b.		n.b.	
Avilamycin	8	13/18	22	26	2o	25	n.b.	
Bacitracin	1o	12	3o	48	26	44	32	44
Boromycin	21	24/28	1o	15	1o	15	12	16
Cephalosporin C	44/7o	48/86	-	Spur	-	-	-	-
Cerulenin	-	16/25	-	11	-	12	-	1o
Chloramphenicol	18	27	-	Spur	-	Spur	-	-
Chlorothricin	-	-	-	9	-	9	n.b.	
Cinerubin A	11	16	15	2o	11	22	18	24
Cladosporin	-	-	-	-	-	-	n.b.	
Cycloserin	-	-	-	-	-	-	-	-
Desferritriacetyl-fusigen	-	-	-	1o	-	9	n.b.	
Elaiophyllin	9	18/21	Spur	8	Spur	8	n.b.	
Erythromycin	25	3o	-	Spur	-	Spur	-	-
Ethericin A	7	9	8	13	9	13	n.b.	
Filipin	-	-	Spur	8	-	Spur	Spur	8
Gentamycin	24	31	-	-	-	-	-	Spur
Granaticin A	16	23	33	44	19	33	3o	42
Imacidin PIb	-	-	Spur	1o	-	9	Spur	11
Ketomycin	-	8	-	-	-	-	Spur	8
Kirromycin	-	Spur	-	8	-	Spur	-	Spur
Kirrothricin	-	-	-	Spur	-	-	-	Spur
Lankamycin	14	17/22	8	1o	-	8	Spur	9
α-Lipomycin	8	8/12	Spur	1o	-	9	8	1o
Lysolipin I	-	8	-	-	-	-	-	Spur
Mitomycin C	31	39	32	42	n.b.		n.b.	
β-Naphthocyclinon	9	11	-	-	-	Spur	n.b.	
Neomycin	23/4o	25/49	-	-	-	-	-	-
Nigericin	21	26/35	1o	11	9	1o	9	11

Tabelle 1: Fortsetzung

Antibioticum (o,1 und 1,o mg/ml)	Hemmhofdurchmesser in mm							
	B.subtilis		H.cutirubrum		H.halobium		H.salinarium	
	o,1	1,o	o,1	1,o	o,1	1,o	o,1	1,o
Nikkomycin	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonactin	1o	13	8	9	8	1o	Spur	9
Nystatin	-	-	-	Spur	-	-	-	-
Penicillin G	29	34	-	-	-	-	-	-
Phosphinothricyl-alanyl-alanin	-	9	-	-	-	-	-	-
Rifampicin	17	23	14	24	1o	2o	n.b.	
Rubromycin	8	1o	Spur	9	Spur	9	n.b.	
Sepedonin	-	8	-	-	-	-	n.b.	
Streptolydigin	-	13/15	-	Spur	-	-	-	Spur
Streptomycin	16	22	-	-	-	-	-	-
Streptothricin	11	17	-	Spur	-	-	n.b.	
Tetracenomycin C	7	15	8	15	Spur	1o	n.b.	
Tetracyclin	16	18/22	-	Spur	-	Spur	-	-
Tirandamycin B	-	-	8	1o	-	1o	9	11
Tylosin	2o	26	-	-	-	Spur	-	Spur
Valinomycin	-	9	-	-	-	-	-	-
Venturicidin X	-	-	8	11	-	8	8	11

bei Angaben mit Schrägstrich bezieht sich die erste Zahl auf den Durchmesser der kompletten Hemmzone, die zweite Zahl auf den Durchmesser der gesamten Hemmzone einschließlich inkompletter Hemmung.

n.b. = nicht bestimmt

1.3. Einfluß von Detergens auf die Wirkung von Antibiotica bei Halobakterien

Durch den Zusatz von EDTA zu Halobakterientestplatten wurde ein eventuell permeabilitätserleichternder Effekt dieses Detergens untersucht. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse hierzu zusammen; die Antibioticakonzentrationen lagen bei 1 mg/ml, die tolerierten EDTA-Werte betrugen o,o5 und o,1 mM. Bei vorher nicht wirksamen Antibiotica konnte auch durch den EDTA-Zusatz keine Hemmung erreicht werden, während die bereits ohne Detergens stark hemmenden Substanzen in ihrer Wirkung beträchtlich verstärkt wurden.

Tabelle 2: Plattendiffusionstest mit verschiedenen Antibiotica unter Zusatz von EDTA zum Komplexmedium für Halobakterien

Antibioticum (1 mg/ml)	mm Hemmhof gegen Halobacterium halobium		
	o,o5 mM EDTA	o,1 mM EDTA	Kontrolle ohne Zusätze
Streptomycin	Spur	Spur	-
Chloramphenicol	-	-	-
Erythromycin	-	-	-
Tetracyclin	-	-	-
Actinomycin D	Spur	Spur	Spur
Neomycin	-	-	-
Cinerubin A	18	19	18
Granaticin A	42	55	35
Avilamycin	25	32	23

2. Beschreibung des Halochinonproduzenten

Der Stamm Tü 2115 wurde 1978 aus einer bei Pucallpa im peruanischen Urwald gesammelten Bodenprobe isoliert. Er ist der Gattung Streptomyces zuzuordnen und nach der Nomenklatur und Systematik von Hütter (1967) durch folgende Merkmale artmäßig gekennzeichnet:

- Die Sporen sind ellipsoid und von glatter Oberfläche.
- Die Sporenketten sind monopodial verzweigt, gerade oder leicht gewellt (Rectus Flexibilis).
- Das Luftmyzel ist anfangs grau-weiß, später rötlich-grau-schwarz (cinnamomeus)
- Das Substratmyzel ist grau-schwarz gefärbt.
- Der Stamm ist chromogen, d.h. auf Pepton-Eisen-Agar wird Melanin gebildet.

Aufgrund dieser Merkmale wurde der Stamm Tü 2115 der Art Streptomyces venezuelae (Ehrlich et al.) zugeordnet.

Bei einer Bestimmung nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974), wo als Kriterien auch C-Quellen-Spektrum und Nitratreduktion herangezogen werden, zeigte Tü 2115 die größte Übereinstimmung mit Streptomyces venezuelae ssp. Xanthophaeus (Lindenbein).+

+ Für die Bestimmung im Rahmen des Mikrobiologischen Großpraktikums danke ich Herrn Prof. Dr. W. Löffler.

3. Optimierung der Halochinonproduktion

Da die Bildung eines Antibioticums an das Vorliegen bestimmter äußerer Voraussetzungen geknüpft ist, kann durch Variation verschiedener Kulturparameter diese Bildung ermöglicht und bis zu einem Maximum gesteigert, d.h. optimiert werden (Lewis & Iljichi 1957, Auden et al. 1967).

Im Kolbenversuch wurden mehrere Faktoren wie N-Quelle, C-Quelle, Belüftung, Art des Impfmaterials sowie Nährlösungszusätze auf ihren Einfluß auf die Halochinonproduktion geprüft. Tabelle 3 faßt die Ergebnisse dieser Tests zusammen und verdeutlicht das Vorliegen einer extremen Abhängigkeit von der verwendeten N-Quelle. Lediglich Sojamehl führt überhaupt zur Halochinonbildung. Unter dieser Voraussetzung waren verschiedene C-Quellen lediglich für das Ausmaß der Produktion verantwortlich. Als beste Nährlösung erwies sich danach eine Kombination aus 2 % Sojamehl und 2 % Mannit. Durch Variation des Anteils von C- und N-Quelle konnte eine leichte Steigerung der Ausbeute bei 3 % Sojamehl und 1 % Mannit erzielt werden (Tabelle 3 b). Der Zusatz von Spurenelementen, Vitaminen, Biotin oder Sojaöl ergab keine auffälligen Steigerungen des Hemmhofdurchmessers im Plattendiffusionstest gegen Halobakterien (Tabelle 3 c). Die größten Unterschiede waren danach im Zellwachstum zu finden, wo durch Biotin eine 2o-3o %ige Steigerung erzielt wurde.

Tabelle 3: Optimierung der Halochinonproduktion

Tab. 3 a: Variation von C- und N-Quelle

A_1	Glucose	B_1	Sojamehl
A_2	Laktose	B_2	Fleischextrakt
A_3	Stärke	B_3	Malzextrakt
A_4	Glyzerin	B_4	Distiller soluble
A_5	Mannit	B_5	Pepton
A_6	Sucrose	B_6	Hefeextrakt

Kombinationen von je 2 % A und B wurden im Kolben zu 1oo ml mit einheitlicher Sporensuspension angeimpft und über 1o Tage auf Halochinonproduktion im Plattendiffusionstest gegen Halobacterium cutirubrum geprüft.

A_1B_1 ++	A_1B_2 -	A_1B_3 -	A_1B_4 -	A_1B_5 -	A_1B_6 -
A_2B_1 +	A_2B_2 -	A_2B_3 -	A_2B_4 -	A_2B_5 -	A_2B_6 -
A_3B_1 ++(+)	A_3B_2 -	A_3B_3 -	A_3B_4 -	A_3B_5 -	A_3B_6 -
A_4B_1 ++(+)	A_4B_2 -	A_4B_3 -	A_4B_4 -	A_4B_5 -	A_4B_6 -
A_5B_1 +++	A_5B_2 -	A_5B_3 -	A_5B_4 -	A_5B_5 -	A_5B_6 -
A_6B_1 ++(+)	A_6B_2 -	A_6B_3 -	A_6B_4 -	A_6B_5 -	A_6B_6 -

Ausmaß der Antibioticaproduktion:
+ = schwach
++ = mäßig
+++ = stark
- = negativ

Tab. 3 b: Variation des prozentualen Anteils von Sojamehl und Mannit

		Produktion	% Sediment
2 % Sojamehl	2 % Mannit	++	8-9
1 % Sojamehl	3 % Mannit	(+)+	6-7
3 % Sojamehl	1 % Mannit	(+)++	1o

Tab. 3 c: Einfluß von Zusätzen zu Medium A_5B_1 auf die Antibioticumproduktion und das Zellwachstum

	% Sediment	mm Hemmhof gegen H.cutir.
Spurenelementlösung		
o,5 ml/1oo ml	1o	23
1,o ml/1oo ml	9	23
Vitaminlösung		
o,5 ml/1oo ml	8-9	23
1,o ml/1oo ml	1o	24
Biotin		
1 µg/l	12	23-24
5 µg/l	1o	23-24
1o µg/l	9-1o	24-25
5o µg/l	8-9	24
1oo µg/l	9-1o	24
Sojaöl		
o,1 %	8-9	23
o,5 %	1o	23-24
1,o %	11	23-24
3,o %	15	23
Kontrolle		
ohne Zusätze	8-9	23

Bei Belüftungsversuchen mit der Medienkombination A_5B_1 war in Standkulturen bei minimalem Zellwachstum keine Antibioticaproduktion zu beobachten. Schüttelkulturen mit schlechter Belüftung (Kolben ohne seitlichen Einstich) bildeten dagegen fast ebensoviel Halochinon wie mäßig und gut belüftete Kulturen (1-4 seitliche Einstiche). Hier war lediglich bereits nach 72-8o h Inkubation eine leichte Rotfärbung als Zeichen der beginnenden Halochinonproduktion festzustellen, während dies bei schlecht belüfteten Kulturen erst nach 86-9o h der Fall war.

Da der Stamm immer wieder in eine Mischpopulation aus dunkler und heller gefärbten Zellen aufspaltete, was gleichzeitig einen Unterschied in der Höhe der Halochinonproduktion beinhaltete, wurde das Impfmaterial regelmäßig überprüft und der Stamm kloniert. Die im Luftmyzel intensiver gefärbten und bei Betrachtung von der Unterseite auf Hefe-Malz-Agar (2) braun-schwarz erscheinenden Klone produzierten viel Antibioticum. Ihr Anteil an der Gesamtpopulation wurde demzufolge möglichst groß gehalten.

Da sich die Produktionsphase mit 1o Tagen (im Schüttelkolben) über einen ungewöhnlich langen Zeitraum erstreckt und während der ersten Tage (8o-9o h) durch einen charakteristischen Abfall des pH-Wertes eingeleitet wird, spielt die Wachstumsphase und der daraus resultierende pH-Wert der zum Animpfen verwendeten Vorkultur eine entscheidende Rolle für die Aufnahme der Halochinonbildung durch die Produktionskultur. War der pH-Wert bereits zu weit abgesunken (6,2 - 6,4), ließen sich die überimpften Zellen nur noch in wenigen Ausnahmefällen in eine erneute "Anlaufphase" mit nachfolgender Produktion bringen. Stattdessen wuchsen die Kulturen ohne Halochinonproduktion weiter. Die kritische Grenze lag hier bei einem Alter der Vorkultur von 5o-6o h. Zu diesem Zeitpunkt war wegen des sehr langsamen Zellwachstums das vorhandene Zellmaterial jedoch noch so gering (5-6 % Sediment), daß die Infektionsgefahr beim Überimpfen - insbesondere auch durch das in dieser Hinsicht durch seinen oft hohen Gehalt an Fremdsporen allgemein pro-

blematische Sojamehl - verhältnismäßig groß war. Aus diesen Gründen wurde eine frisch abgeschwemmte Sporensuspension als Impfmaterial für alle Fermentationen bevorzugt, sowie der prozentuale Anteil von Sojamehl im Medium bei 2 % belassen. Mit Medium Nr. 1 ließen sich im Schüttelkolben bei einer Inkubationstemperatur von 27°C und mittlerer Belüftung maximale Ausbeuten von 145 mg Halochinon pro l Kultur erzielen.

4. Herstellung von Halochinon

4.1. Fermentation

Neben der Kultur in Schüttelkolben zu 1oo ml wurden zur Herstellung größerer Mengen des Antibioticums Fermentationen im 1o l- und 25 l-Maßstab durchgeführt. Die entsprechenden Fermentationsbedingungen sind unter II.5.2. aufgeführt. Abbildungen 2 a und 2 b zeigen den Verlauf von Fermentationen im 1oo ml Kolben und in einem 25 l-Fermenter. Die antibiotische Aktivität läßt sich erstmals nach 3-4 Tagen Inkubation im Plattendiffusionstest nachweisen, nimmt bis zu einem Maximum nach etwa 2 Wochen zu, um dann innerhalb von weiteren 2 Wochen langsam wieder abzufallen. Die Kulturen zeigen nur ein geringes Zellwachstum mit maximal 9 % Sediment, erreichen das Produktionsmaximum im Schüttelkolben nach 14-16 Tagen, im 1o l-Fermenter nach 14 Tagen und im 25 l-Fermenter nach 1o-11 Tagen. Eine Lyse der Kultur im Anschluß an das Produktionsmaximum konnte über einen Inkubationsverlauf von insgesamt 4 Wochen nicht in nennenswertem Umfang festgestellt werden.

Die maximal erreichten Ausbeuten lagen bei 145 mg/l im Schüttelkolben und 12o mg/l im 1o l-Fermenter. Größere Fermentationen wurden in der Regel nach 1o Tagen beendet, wobei die Ausbeute bei 8o-1oo mg/l lag.

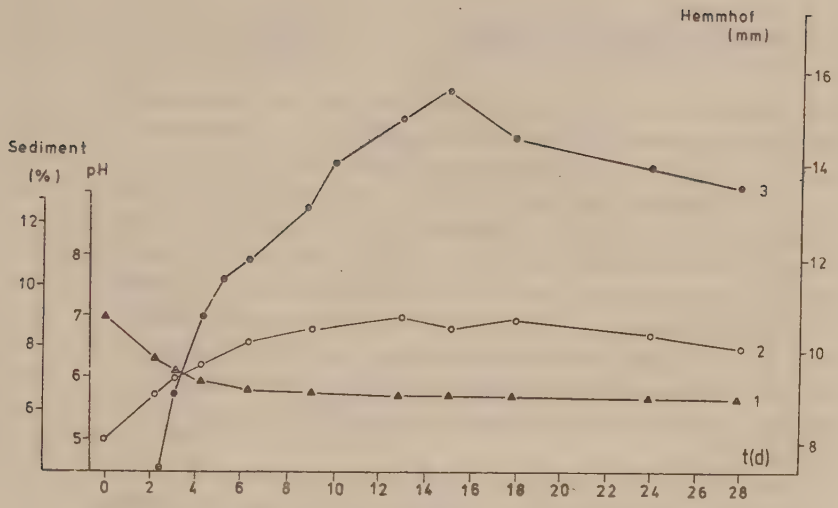


Abb. 2 a: Verlauf einer Fermentation im Schüttelkolben (100 ml)
1 = Wachstumsverlauf als % Sediment
2 = pH-Verlauf
3 = Verlauf der Aktivität gegen Halob. cutirubrum

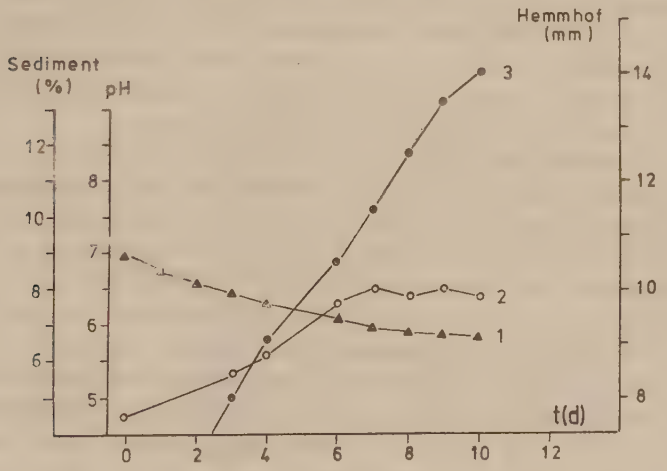


Abb. 2 b: Verlauf einer 25 l-Fermentation
1 = Wachstumsverlauf als % Sediment
2 = pH-Verlauf
3 = Verlauf der Aktivität gegen Halob. cutirubrum

4.2. Aufarbeitung und Reinigung

Die Aufarbeitung der Kulturflüssigkeit und die Isolierung des Antibioticums erfolgte wie unter II.6. beschrieben und ist in Abb. 3 zusammenfassend dargestellt.

Die Ansäuerung der Kultur bereits vor der Filtration erwies sich als unbedingt notwendig, weil bei neutralem pH-Wert eine schleimige Emulsion entstand, durch die keine befriedigende Trennung von Kulturfiltrat und Myzel mit darin enthaltener Aktivität möglich war. Im alkalischen Bereich bei pH 11-12 ließ sich bei kleineren Probeaufarbeitungen keine Filtration an der Wasserstrahlpumpe durchführen, ebenso wie bei einer zu starken Ansäuerung auf pH-Werte unter 4.

Nach der Abtrennung des klaren Kulturfiltrats, das keine meßbare Aktivität mehr enthielt, wurde das Myzel 6-7 mal mit Methanol extrahiert (jeweils 1/1o Kulturvolumen).

Um einerseits bei größeren Aufarbeitungen den Methanolverbrauch in vertretbaren Grenzen zu halten, andererseits aber auch eine möglichst vollständige Extraktion zu erreichen, wurden einige weitere Extraktionsmöglichkeiten überprüft. Tabelle 4 stellt diese Versuche dar und gibt Aufschluß über die Ausbeuten der einzelnen Schritte.

Mit Methanol als alleinigem Lösungsmittel wurden 6 Schritte benötigt, um 9o % der Gesamtaktivität zu erhalten. Bei Einsatz von Chloroform nach 1-2 Methanolschritten verringerte sich diese Zahl auf 3-4. Dies gilt ebenfalls für Extraktionen mit alkalischem Methanol (o,5 % NaOH), wo gleichfalls eine 9o %ige Ausbeute mit 4 Schritten erreichbar war. Diese Extraktion wurde bei Aufarbeitung einer 2oo l-Fermentation durchgeführt; die übrigen Alternativen sind wegen der erheblichen Gesundheitsbelastung -speziell durch Chloroform- nur in kleinerem Maßstab unter einem Abzug durchzuführen.

Mit der nachfolgenden Konzentrierung der Extrakte bis zum wässrig/öligen Rückstand und anschließendem Ausschütteln mit Chloroform wurde sodann die Aufarbeitung nach Abb.3 entsprechend fortgesetzt.

Abb. 3: Aufarbeitungsschema

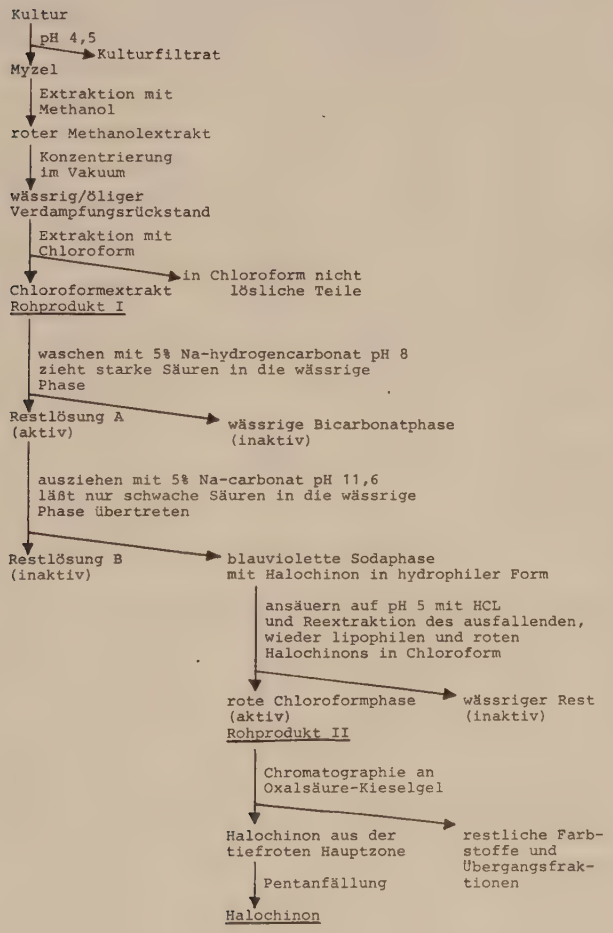


Tabelle 4: Extraktionsbilanz bei verschiedenen Lösungsmitteln. Es wurden jeweils 5oo ml Kultur aufgearbeitet (vergl. II.6.5.)

Extraktion mit je 1oo ml	mm Hemmhof gegen H. cuti.	extrahierte Menge Halochinon in %
1. Methanol	18	7
2. Methanol	17	12
3. Methanol	16	2o
4. Methanol	16	22
5. Methanol	16	17
6. Methanol	16	12
7. Methanol	16	6
8. Methanol	15,5	3
9. Methanol	15	1
1. Methanol	19	4
2. Methanol	17	9
3. Methanol	17,5	11
4. Chloroform	17	46
5. Chloroform	16	25
6. Chloroform	15,5	5
7. Chloroform	15	1
1. Methanol	18	3
2. Methanol	17	6
3. Chloroform	16	6o
4. Chloroform	15,5	24
5. Chloroform	15	6
6. Chloroform	14,5	1
1. Methanol/NaOH	> 29	> 55
2. Methanol/NaOH		
3. Methanol/NaOH	18	22
4. Methanol/NaOH	17	13
5. Methanol/NaOH	16,5	5
6. Methanol/NaOH	16,5	3
7. Methanol/NaOH	16,5	2

Für die abschließende Trennung an Kieselgel wurden anfänglich präparative Platten benutzt. Vorbereitung und Durchführung erfolgten wie unter II.6.3.2. beschrieben.

Zur Reinigung größerer Mengen an Antibioticum war die Chromatographie an einer Kieselgelsäule (siehe II. 6.3.1.) günstiger. In jedem Fall mußte das Kieselgel zuvor mit Oxalsäure oder Weinsäure vorbehandelt werden, da sich ansonsten keine scharf begrenzte Halochinonbande erzielen ließ. Offensichtlich erfolgte eine Salzbildung mit dem Kieselgel unter "Verschmieren" der Halochinonfraktion mit nachfolgenden Komponenten.

An säurebehandeltem Kieselgel ließ sich dagegen zunächst eine intensiv orange gefärbte Fraktion eluieren, gefolgt von einer schwach gelben, die beide keine biologische Aktivität gegen Halobakterien zeigten. Es folgte dann die intensiv rot bis schwarzrot gefärbte Halochinonfraktion und nachfolgend noch mehrere weitere Farbstoffe, die ebenfalls inaktiv waren.

Nach Auswaschen von eventuell verbliebenem Kieselgel und überschüssiger Säure wurde das Halochinon über Na-Sulfat getrocknet, in n-Pentan umgefällt und lag abschließend als chromatographisch reine Substanz vor.

5. Physikalische und chemische Eigenschaften von Halochinon

Halochinon ist ein rotes, optisch inaktives, amorphes Pulver, das im Hochvakuum (o,o1 Torr) bei 120°C sublimiert und einen Schmelzpunkt von 226°C hat. Es hat die Summenformel $C_{17}H_{12}O_5$ und somit eine Molmasse von 296,2.

5.1. Löslichkeit

Halochinon ist gut löslich in Chloroform:	5,3	mg/ml
Aceton:	1,3	mg/ml
und wässrigem Alkali:	2,o	mg/ml
bedingt löslich in Äthanol :	o,4	mg/ml
und Methanol :	o,15	mg/ml

sowie unlöslich in Pentan und Wasser.

5.2. Stabilität

Als rotes Pulver ist die Haltbarkeit offensichtlich sehr gut. Über den Arbeitszeitraum von 2 Jahren wurde kein Aktivitätsverlust festgestellt.

Die biologische Aktivität einer Chloroformlösung blieb unbeeinflußt von Licht und Temperatur über mehrere Wochen stabil. Über den Einfluß dieser Parameter (Licht und Temperatur) auf die Aktivität des Antibioticums in anderen Lösungsmitteln gibt Tabelle 5 Aufschluß. Bei längerem Stehen in Aceton oder alkalischer Lösung trat zusätzlich eine Verfärbung von ursprünglich rot bzw. blau nach braungelb bzw. grünblau auf.

Tabelle 5: Stabilität von Halochinon in verschiedenen Lösungen

Lösungsmittel (mg/ml)	mm Hemmhof gegen H.cutirubrum						
	sofort	27 Tage 4°C dunkel	6 Monate 4°C dunkel	7 Tage RT hell	dunk.	48 h 37°C hell	dunk.
Aceton							
(1,o)	27	27	21	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
(o,6)	25	25	19	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
(o,4)	23	n.b.	n.b.	21	19	23	23
Soda							
(1,o)	23	2o	9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
(o,1)	18	12	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
H_2O pH 13							
(o,5)	16	13	n.b.	n.b.	n.b.	13	13
Methanol/NaOH pH 13							
(o,5)	15	11	n.b.	n.b.	n.b.	-	9

5.3. Dünnschichtchromatographie

Im Dünnschichtchromatogramm zeigt Halochinon bei verschiedenen Laufmitteln an Kieselgel folgendes Verhalten:

Laufmittelsystem	R_f - Wert
Chloroform	o,32
Chloroform/1o % Aceton	o,55
Chloroform:Benzol (1:1)	o,16
Benzol/Äther/Aceton (9:9:2)	o,57

5.4. Strukturermittlung von Halochinon [+)]

Halochinon ist ein Indikator, der in saurer und neutraler Lösung rot und in alkalischer Lösung blau gefärbt ist. Seine Reaktionen sind typisch für ein Hydroxychinon. Die spektroskopischen Daten lassen sich weitgehend mit denen von Pilochinon vergleichen, einem als biologisch nicht aktiv beschriebenen Farbstoff aus Streptomyces pilosus (Johnson et al. 1963; Polonsky et al. 1963; Gaudemer et al. 1963; Zylber et al.1969,Lounasmaa & Zylber 1969). Halochinon ist demnach 3-Acetyl-1,8-dihydroxy-2-methyl-9,10-phenanthrenchinon und unterscheidet sich von Pilochinon lediglich in der Seitenkette am C_3-Atom (Abb. 4).

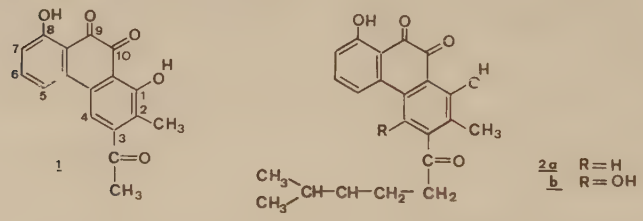


Abb. 4: Struktur von Halochinon (1) und Pilochinon (2a)
2b = Hydroxypilochinon

Auch die chemischen Reaktionen von Halochinon und Pilochinon sind vergleichbar. Insbesondere läßt sich ein gelbes Derivat mit o-Phenyldiamin gewinnen, das die ortho-Chinon-Struktur beweist.

In den nachfolgenden Abbildungen 5-8 sind die Spektren von Halochinon dargestellt.

[+)] für die Durchführung der Versuche zur Strukturermittlung sowie für die freundliche Überlassung der Daten danke ich Herrn Dr. B. Krone, Organisch-Chemisches-Institut der Universität Göttingen.

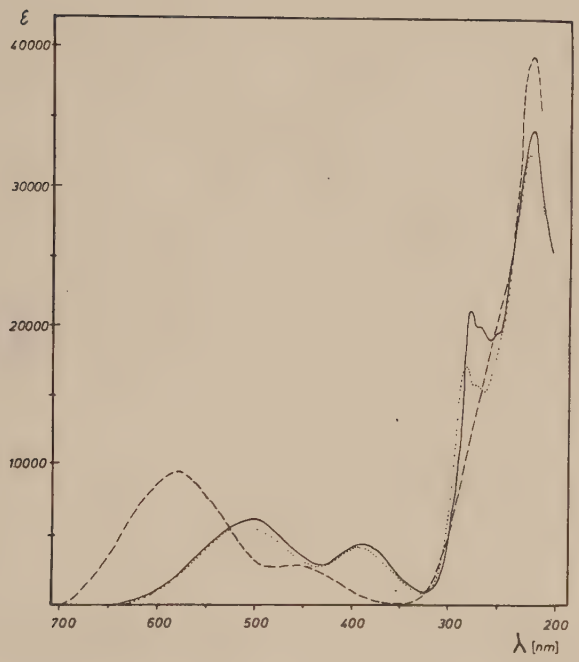


Abb. 5: Elektronenspektrum von Halochinon in Äthanol ——
und o,o1 M äthanolischer NaOH-----
sowie von Pilochinon in Äthanol.....

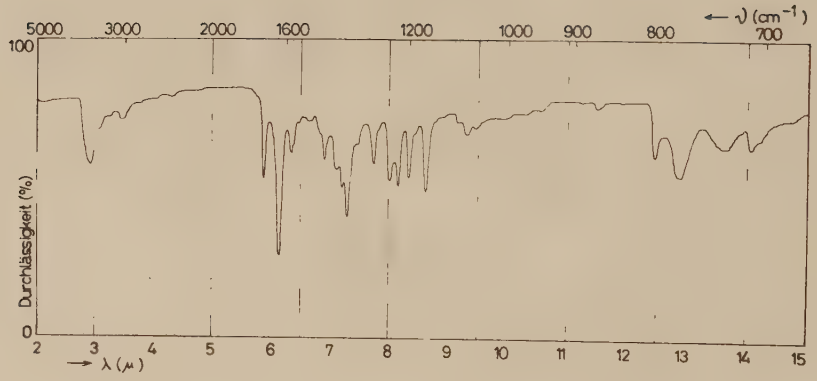


Abb. 6: IR-Spektrum (KBr) von Halochinon

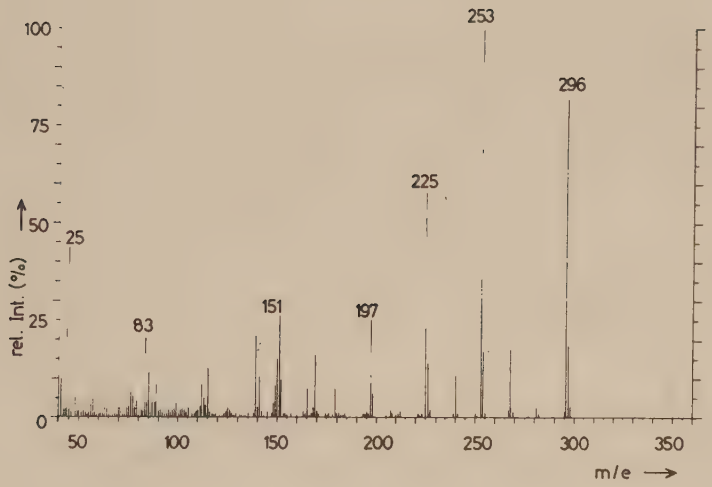


Abb. 7: Massenspektrum (7o eV) von Halochinon

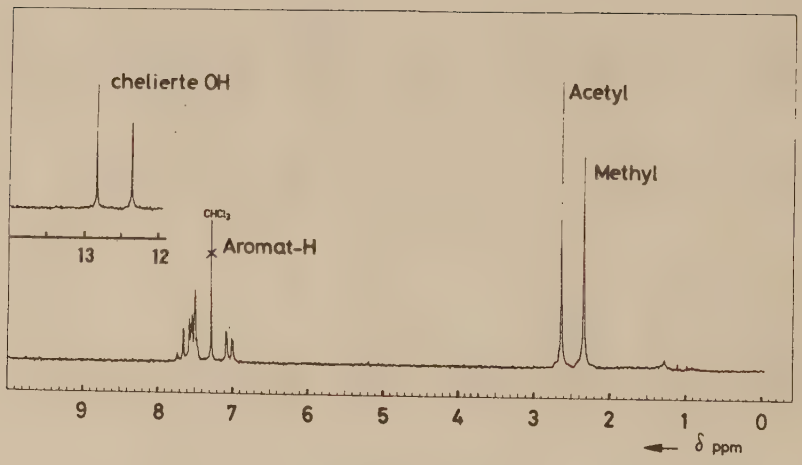


Abb. 8: 1oo-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von Halochinon in $CDCl_3$

6. Biologische Charakterisierung von Halochinon

6.1. Wirkungsspektrum

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse des antibakteriellen Wirkungsspektrums zusammengefaßt. Es wurden die Hemmhofdurchmesser im Plattendiffusionstest sowie die minimalen Hemmkonzentrationen im Verdünnungsreihentest auf Komplexmedium bestimmt. Die genauen Angaben zur Versuchsdurchführung sind unter II.8.1./2. zu finden.

Unter den Bakterien wurden hauptsächlich gram positive, aber auch einige gram negative Keime gehemmt. Schwerpunkte lagen offensichtlich bei den Arthrobakterien, Mycobakterien, Mycoplasmen und naturgemäß den Halobakterien als die im Screening eingesetzten Vertreter der Archaebakterien.

Oft ging der bakteriziden Wirkung eine bei geringeren Konzentrationen bakteriostatische Hemmung voraus.

Bei der Aufnahme des antifungischen Spektrums, das in Tabelle 7 dargestellt ist, erwies sich im Plattendiffusionstest keiner der getesteten Pilze als sensitiv gegenüber Halochinonkonzentrationen von o,1 und 1 mg/ml.

Tabelle 6: Antibakterielles Wirkungsspektrum von Halochinon

	Teststamm	mm Hemmhof im Plattendiffusionstest bei (µg/ml) 1	1o	1oo	1ooo
gram negativ	Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-
	E. coli K 12	-	-	-	-
	Proteus vulgaris	-	Sp	7-8	8
	Proteus mirabilis	-	-	8	9
	Achromobacter geminiani	-	-/1o	Sp/11	9/13
	Salmonella typhimurium	-	-	-	-
	Alcaligenes faecalis	-	-	-	-
	Mycoplasma pneumoniae				
	Mycoplasma hominis				
	Mycoplasma pulmonis		nur mit Verdünnungsreihe in Microtiterplatten getestet *		
	Mycoplasma gallisepticum				
	Mycoplasma laidlawii				
	Ureaplasma				
gram positiv	Propionibakt. freudenr.	-	-	-	Sp
	Mycobacterium spec.	-	1o	12	14
	Nocardia brasiliensis	-	-/9	-/11	-/12
	Corynebacterium rathayi	-	-	8	9
	Corynebacterium poins.	-	-	Sp	9
	Brevibacterium linens	-	-/9	Sp/1o	8/11
	Brevibacterium flavum	-	-	7-8	8
	Brevibacterium sterol.	-	-	-	-
	Micrococcus luteus	-	-/9	-/9	-/1o
	Arthrobacter aurescens	-/9	8/12	1o/13	1o/14
	Arthrobacter citreus	-	-	7-8	8
	Arthrobacter crystallop.	8/1o	16/19	17/2o	17/2o
	Arthrobacter globiformis	-/9	9/14	1o/14	1o/14
	Arthrobacter oxydans	8/11	16	16-17	17
	Arthrobacter pascens	9/11	14/18	14/19	14/19
	Lactobacillus casei	-	-	-	Sp
	Lactobacillus brevis	-	-	-	-
	Streptococcus faecalis	-	-/1o	-/12	-/13
	Leuconostoc mesent.	-	-/11	8/13	8/14

Tabelle 6: Fortsetzung

minimale Hemmkonzentrationen im Verdünnungsreihentest (µg/ml)	
Bakteriostase	Bakterizidie
> 1oo	> 1oo
> 1oo	> 1oo
1	5o
< o,1	5
o,5	1oo
> 1oo	> 1oo
> 1oo	> 1oo
———	25
———	> 1oo
———	1,56
———	6,25
———	> 1oo
———	> 1oo
> 1oo	> 1oo
o,1	1
o,5	1o
< o,1	1o
o,5	> 1oo
1o	1oo
1o	> 1oo
> 1oo	> 1oo
1o	> 1oo
< o,1	5
1	1o
o,5	5
o,1	1
o,5	5
o,1	1
25	> 1oo
> 1oo	> 1oo
5	> 1oo
1o	> 1oo

Tabelle 6: Fortsetzung

	Teststamm	mm Hemmhof im Plattendiffusionstest bei (µg/ml) 1	1o	1oo	1ooo
	Staphylococcus aureus	-	Sp	7-8	8/1o
	Bacillus subtilis	-	-	8	9
	Bacillus brevis	-	-	9	11
	Clostridium pasteur.	-	-	-	-
Archaeb.	Halobacterium cutirubr.	-	Sp/1o	11/18	12/19
Archaeb.	Halobacterium halobium	-	8/1o	12/17	13/19
Archaeb.	Halobacterium salinar.	-	Sp/1o	11/16	12/17

* Die Tests mit Mycoplasmen wurden bei Fa. Thomae, Biberach, durchgeführt. Herrn Dr. R. Werner danke ich für die freundliche Unterstützung.

Tabelle 6: Fortsetzung

minimale Hemmkonzentration im Verdünnungsreihentest (µg/ml)	
Bakteriostase	Bakterizidie
1o	> 1oo
1o	1oo
o,1	1o
> 1oo	> 1oo
o,5	5
1	1o
o,1	1

Tabelle 7: Antifungisches Wirkungsspektrum

Teststamm	Hemmung bei o,1	1 mg/ml
Ascomycetes und Deuteromycetes		
Hefeartige: Pichia farinosa	-	-
Saccharomyces cerev.	-	-
Candida albicans	-	-
Andere : Botrytis cinerea	-	-
Aspergillus versicolor	-	-
Aspergillus niger	-	-
Penicillium chrysog.	-	-
Trichophyton spec.	-	-
Endomyces magnusii	-	-
Paecilomyces varioti	-	-
Basidiomycetes		
Ustilago maydis	-	-
Rhodotorula ruber	-	-
Zygomycetes		
Mucor mihei	-	-
Mucor hiemalis	-	-

6.2. Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Wachstumsphase des Testorganismus im Biophotometerversuch

Bei Verwendung einer bereits stationär gewachsenen Vorkultur von Halobacterium cutirubrum als Impfgut, d.h. bei Einwirkung des Antibioticums auf ruhende Zellen, führte auf Minimalmedium bereits eine Konzentration von o,1 µg/ml zur irreversiblen Zellschädigung und damit zum Absterben der Kultur (Abbildung 9).

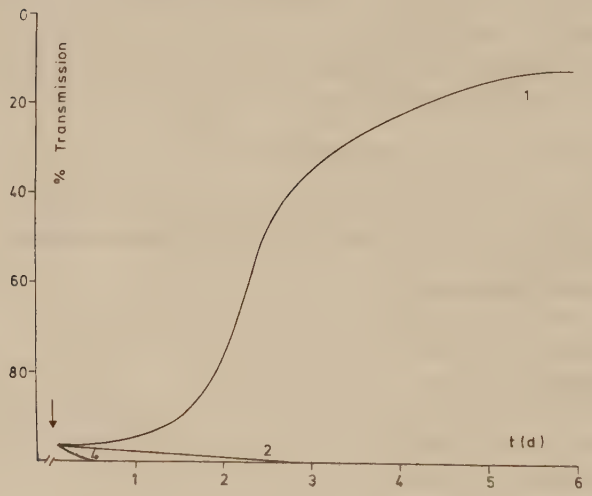


Abb. 9: Einfluß von Halochinon auf ruhende Zellen von Halobacterium cutirubrum in Minimalmedium.
(Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe)

1 = Kontrolle
2 = o,1 µg/ml Antibioticum
4 = 1 µg/ml Antibioticum

Bei Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase als Impfmaterial hatte dieselbe Antibioticumkonzentration keinen Effekt. Erst o,5 µg/ml führten zu einem rascheren Abknicken der Wachstumskurve und 1 µg/ml zu einem Absterben der Kultur nach einer anfänglichen Wachstumsphase (Abbildung 1o).

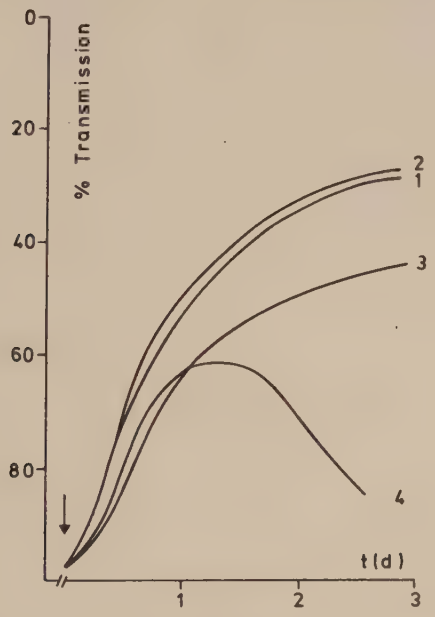


Abb. 1o: Einfluß von Halochinon auf logarithmisch wachsende Zellen von Halobacterium cutirubrum in Minimalmedium.
(Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe)

1 = Kontrolle
2 = o,1 µg/ml Antibioticum
3 = o,5 µg/ml Antibioticum
4 = 1 µg/ml Antibioticum

Vergleichbare Resultate ergaben sich bei Komplexmedium als Nährlösung. Hier waren allerdings bei ruhenden Zellen bereits o,5 - 1 µg/ml Halochinon notwendig, um eine irreversible Zellschädigung zu bewirken. Im Fall einer Vorkultur, die sich bei Zugabe von 1 µg/ml Halochinon am Beginn der logarithmischen Wachstumsphase befand, begannen die Zellen nach einer Verzögerung von 3 Tagen doch noch mit einem normalen Wachstum. o,1 µg/ml Halochinon hatten hier den früheren Übergang in die stationäre Phase zur Folge (Abbildung 11).

Wurde das Antibioticum während des Versuchs in der zweiten Hälfte der log-Phase zugesetzt, erfolgte sofortiger Übergang in die stationäre Phase.

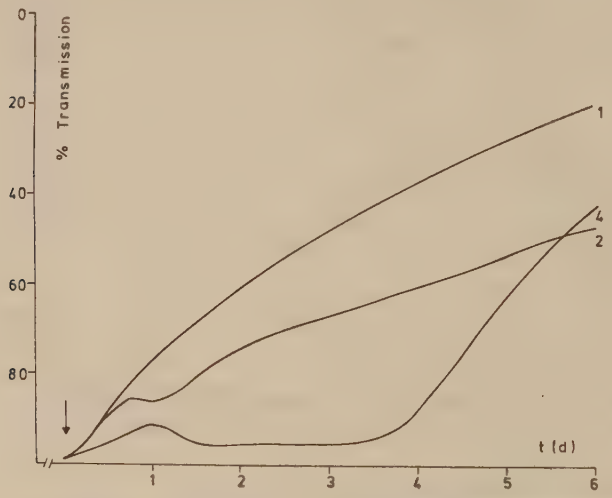


Abb. 11: Einfluß von Halochinon auf Zellen von Halobacterium cutirubrum zu Beginn der logarithmischen Waschstumsphase in Komplexmedium.
(Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe)

1 = Kontrolle
2 = o,1 µg/ml Antibioticum
4 = 1 µg/ml Antibioticum

6.3. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Halochinonkonzentration und der Diffusionsmöglichkeit - Standardisierung der Testplatten

Bei einer Titerbestimmung mit der Bakterienzählkammer ergaben sich für drei Werte der $Extinktion_{578}$ am Photometer die folgenden Zahlen:

$$OD = 0{,}25 \quad \triangleq \quad T = 7{,}3 \times 10^{7}$$
$$OD = 0{,}5 \quad \triangleq \quad T = 1{,}4 \times 10^{8}$$
$$OD = 1{,}0 \quad \triangleq \quad T = 2{,}7 \times 10^{8}$$

Tabelle 8 zeigt die dazugehörige Abhängigkeit der Hemmhofdurchmesser von der Halochinonkonzentration unter verschiedenen Diffusionsbedingungen. Es wurden Eichlösungen in Chloroform (rot) und in alkalischem Methanol (blau) hergestellt und im Plattendiffusionstest gegen Halobacterium cutirubrum getestet.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß eine absolute Zuordnung von Hemmhofdurchmesser und eingesetzter Antibioticumlösung nur bedingt getroffen werden kann. Zum einen besteht wie aus III.6.2. ersichtlich eine starke Abhängigkeit vom Alter der verwendeten Kultur (größere Hemmhöfe bei stationär gewachsenen Vorkulturen), zum anderen wächst die Größe des Hemmhofes nicht gleichmäßig mit steigender Halochinonkonzentration (Abbildung 12). Eine solche gleichbleibende Steigung wurde nur bei den Platten mit der höchsten Einsaatdichte beobachtet, weshalb in der Regel für Fermentations- und Aufarbeitungskontrollen diese Bedingungen bevorzugt wurden. Es war lediglich darauf zu achten, daß zumindest innerhalb einer Versuchsreihe die gleiche Wachstumsphase der Vorkultur beim Herstellen der Testplatten vorlag.

Tabelle 8: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Keimdichte und der Antibioticumkonzentration in Chloroform und alkalischem Methanol

OD_{578}	mm Hemmhof gegen H. cutirubrum								
	Chloroform				Methanol (alk.)				
	o,o1	o,o5	o,1	o,5	1,o	o,o1	o,o5	o,1	o,5
o,25	9	1o	13,5	15	15	-	8	12	17
o,5	-	Spur	9	11	12	-	Spur	11	16
1,o	-	Spur	8	1o	11	-	Spur	1o	13

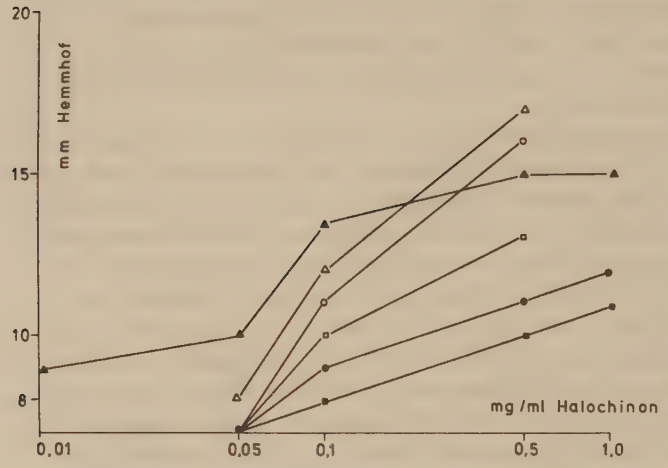


Abb. 12: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Antibioticumkonzentration bei verschiedenen Lösungsmitteln und Keimdichten

OD = o,25/Titer 7,3 x $1o^7$ ▲ = Chloroform
△ = Methanol

OD = o,5/Titer 1,4 x $1o^8$ ● = Chloroform
○ = Methanol

OD = 1,o/Titer 2,7 x $1o^8$ ■ = Chloroform
□ = Methanol

6.4. Einfluß von Halochinon auf die Makromolekülsynthese in vivo

Für viele Antibiotica liegt der primäre Angriffsort im Bereich der Synthese von Zellwand, Protein, RNS oder DNS. Dies gilt insbesondere auch für die gegen Halobakterien stark wirksamen Antibiotica Bacitracin, Granaticin A und Mitomycin C. Aufgrund der Chinonstruktur des Halochinon wurde sofort eine ähnliche Wirkung vermutet und der Einfluß auf Protein-, RNS- und DNS-Synthese geprüft. Als Testorganismus diente Halobacterium cutirubrum, die genauen Versuchsbedingungen sind unter II.8.4. beschrieben.

Die Abbildungen 13, 14 und 15 geben die Ergebnisse der Einbauversuche mit radioaktiv markierten Bausteinen der jeweiligen Synthese wieder.

Bei Einbau von ^{14}C-Alanin verlief die Proteinsynthese während der ersten 45-6o Minuten nach der Halochinonzugabe parallel zur Kontrolle unbeeinflußt weiter, um erst danach auf einen Wert von 45 % der Synthese der Kontrolle abzufallen. Der Einbau von ^{14}C-Uracil in die RNS wurde bereits gleich nach Zugabe des Antibioticums gehemmt, verlief jedoch über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich ansteigend. Die Einbaurate lag am Versuchsende bei 25 % der Kontrolle. Im Vergleich dazu wurde der Einbau von ^{14}C-Thymidin in die DNS ebenfalls sofort gehemmt, hier blieb die Einbaurate jedoch über den gesamten Zeitraum des Versuches konstant niedrig bei 1o-12 % der Kontrolle.

Diese Ergebnisse sprechen stark für die DNS oder eventuell auch die RNS als primären Wirkort des Halochinons.

Die in jedem Versuch vergleichsweise mitgetesteten Antibiotica Chloramphenicol, Rifampicin und Actinomycin D hatten - wie bereits aus den Ergebnissen des Sensitivitätsspektrums der Halobakterien gegenüber Antibiotica zu erwarten - nur eine mäßige Hemmwirkung von 5o %. Die entsprechenden Kurven lassen sich zwar in die Abbildungen aufnehmen, haben aber keinen besonderen Aussagewert.

Tabelle 9 stellt die Resultate aller Versuche zusammenfassend dar.

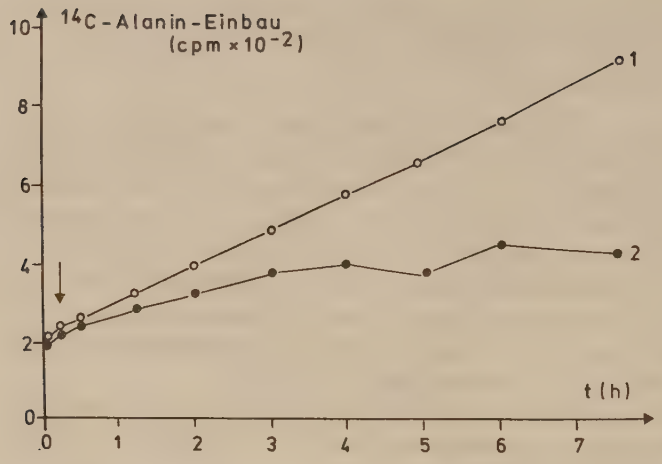


Abb. 13: Einbau von ^{14}C-Alanin in Protein bei H.cutirubrum (Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe)
1 = Kontrolle 2 = 1 µg/ml Halochinon

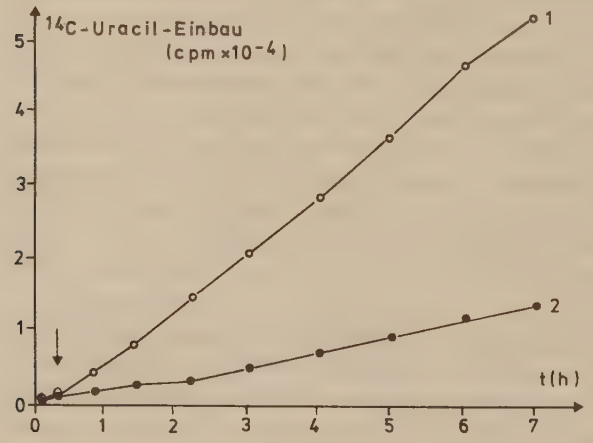


Abb. 14: Einbau von ^{14}C-Uracil in RNS bei H.cutirubrum (Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe)
1 = Kontrolle 2 = 1 µg/ml Halochinon

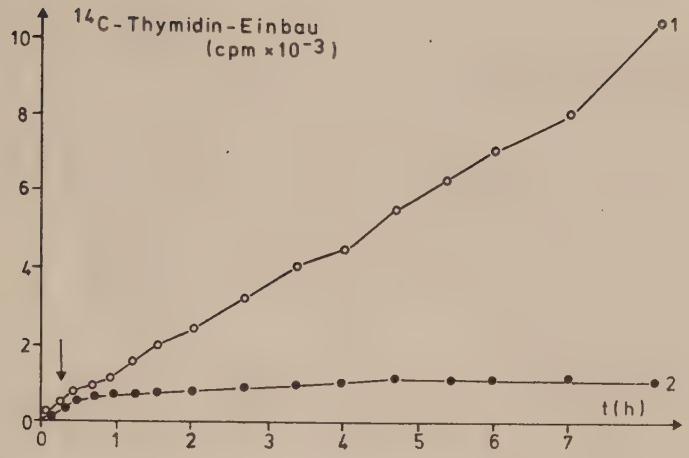


Abb. 15: Einbau von ^{14}C-Thymidin in DNS bei H.cutirubrum (Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe)

1 = Kontrolle
2 = 1 µg/ml Halochinon

Tabelle 9: Hemmwirkung der getesteten Antibiotica auf die Makromolekülsynthese in vivo bei H.cutirubrum.

Antibioticum	Konzentration	% Hemmung der Synthese von		
		DNS	RNS	Protein
Halochinon	1 µg/ml	88	74	57
Actinomycin D	5 µg/ml	5o	—	—
Rifampicin	3o µg/ml	—	6o	—
Chloramphenicol	1oo µg/ml	—	—	5o

6.5. Interaktion von Halochinon mit Kalbsthymus-DNS in vitro

Bei einer Reihe von farbigen Hemmstoffen der DNS-Synthese läßt sich die direkte Wechselwirkung mit der DNS durch eine sogenannte "Rotverschiebung" nachweisen. Es handelt sich hierbei um die Verschiebung des im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums liegenden Absorptionsmaximums der betreffenden Substanz nach Inkubation mit DNS um 1o-3o nm weiter in den längerwelligen Bereich.

Durch einen entsprechenden Versuch (wie unter II.8.5. beschrieben) mit dem hier vorliegenden Halochinon sollte sich eine Differenzierung zwischen DNS und RNS als primärem Wirkort erzielen lassen.

Abbildung 16 stellt die Ergebnisse dieses Versuchs dar. Es läßt sich eine eindeutige Verschiebung des Absorptionsmaximums im sichtbaren Wellenlängenbereich von 512 nach 537 nm feststellen, was für eine direkte Interaktion des Halochinons mit der DNS als Wirkmechanismus spricht.

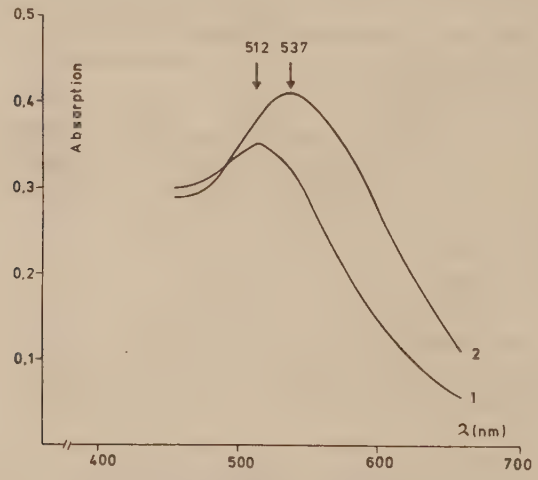


Abb. 16: Verschiebung des Absorptionsmaximums von Halochinon im sichtbaren Wellenlängenbereich nach Inkubation mit DNS.
1 = Halochinon in Puffer
2 = Halochinon in Puffer mit DNS

IV. DISKUSSION

Chinone können von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren in großer Variabilität gebildet werden. Innerhalb des Primärstoffwechsels erfüllen sie wichtige Zwischenfunktionen bei einer Reihe von Stoffwechselreaktionen wie Atmungskette und oxidative Phosphorylierung, Photosynthese oder Melaninbildung (Hoffmann-Ostenhof 1963).

Die Bedeutung von Ubichinon als Elektronen- und Protonen-Überträger (Redoxcarrier) innerhalb der Atmungskette wurde beispielsweise durch Rekonstitutionsexperimente (Ernster et al. 1969), kinetische Messungen (Kröger & Klingenberg 1973) und Untersuchungen zu Oberflächeneigenschaften und Beweglichkeit in Phospholipidschichten (Quinn & Esfahani 198o) eindeutig charakterisiert.

Zusätzlich zu solchen katalytischen Funktionen wird von Regulationseigenschaften bei Chinonen berichtet; so zum Beispiel scheint ebenfalls Ubichinon die Aktivität der Succinatdehydrogenase (Gutman et al. 1971 a,b) und des Cytochrom b-c_1 Komplexes (Nelson et al. 1972) zu regulieren. Über die Mechanismen einer solchen Wirksamkeit herrscht allerdings noch weitgehend Unklarheit.

Als Produkte des Sekundärstoffwechsels können Chinone als dritte wichtige Funktion die unterschiedlichsten Inhibitoreigenschaften aufweisen. Über die physiologische Rolle solcher Hemmstoffe in der Natur, wenn man überhaupt eine solche annehmen kann, gibt es nur wenige Belege. So zum Beispiel die Synthese von Chinonen als Abwehrstoffe gegen Bakterien und Pilze bei bestimmten Käfern (Schildknecht 197o und 1971) oder die Produktion eines Chinons im Vorstadium der Sporulation bei einem Pilz, um die Mitochondrienfunktion und Makromolekülsynthesen zu stoppen (Vogel & Weaver 1972, Vogel et al. 1974 u. 1975). Für weitaus die meisten Inhibitoren wurde bisher jedoch keine "sinnvolle" Funktion erkannt, wie es für Sekundärmetabolite generell postuliert wird, die als Produkte einer "Spielwiese des Stoffwechsels" Vorreiter der Evolution sein könnten. Eine

positive Funktion würde in diesem Konzept bereits den Übergang einer Struktur von der Ebene des Sekundärstoffwechsels auf die des streng kontrollierten Primärstoffwechsel bedeuten (Zähner 1978).

Unabhängig von ihrer vorhandenen oder nicht vorhandenen Funktion in der Natur kündigte sich die Bedeutung der Chinone für die medizinische Therapie bereits während des zweiten Weltkrieges an, als eine intensive Suche nach Antimalaria-Mitteln betrieben wurde und verstärkte sich nachfolgend immer mehr durch die Entdeckung von Antitumor-Eigenschaften vieler Vertreter dieser Substanzgruppe (Adriamycin, Daunomycin, Carminomycin, Mitomycin C, Streptonigrin, Lapachol). Die heute in der großen Gruppe der Chinon-Antibiotica zusammengefaßten Substanzen zeichnen sich zwar alle durch das Vorkommen der für sie namengebenden Chinongruppierung aus, sind aber insgesamt doch von so vielfältiger und unterschiedlicher Struktur, daß es bisher unmöglich scheint, ihnen ein einheitliches Reaktionsmuster in ihrer Wirkungsweise oder ein gemeinsames Angriffsziel zuzuordnen, wie dies für viele andere Antibioticaklassen möglich ist (ß-Lactame, Aminoglycoside, Polyene, Ionophore, etc.). In den meisten Fällen wird für Chinonantibiotica die Hemmung einer Makromolekülsynthese beschrieben, wobei die DNS als primärer Angriffsort gegenüber RNS und Ribosom im Vordergrund zu stehen scheint. Als Folge dieser primären Wirkung auf die DNS lassen sich dann Hemmungen von Replikation oder Transcription unterscheiden. Dies gilt unter anderem für Daunomycin, Adriamycin, Mitomycin C, Rubidazon (Zunino et al. 1972, Gabbay et al. 1976, Pigram et al. 1972, Sartiano et al. 1979). Ein direkter Einfluß auf die Proteinsynthese wird dagegen für Granaticin, Aranciamycin und Naphthomycin beschrieben (Kersten 1971, Ogilvie & Kersten 1979).
Die meisten bisher bekannten Chinone lassen sich in eine der folgend aufgeführten Hauptgruppen einordnen, die jeweils mindestens 15o Substanzen umfassen. Die dazu angegebenen Prozentanteile an medizinisch einsetzbaren Vertretern in den einzelnen Gruppen entstammen einer Aufstellung von

Driscoll (1974) in Zusammenhang mit Untersuchungen an 1500 natürlich vorkommenden Chinonen, die in vivo und bei Zellkulturen auf Aktivität getestet wurden.

1. Benzochinone	11 % aktiv	(30 von 266)
2. Naphthochinone	7 % aktiv	(30 von 458)
3. Anthrachinone	2 % aktiv	(9 von 379)
4. N-heterocyclische Chinone	16 % aktiv	(24 von 151)

Zusätzlich zu den natürlich vorkommenden Chinonen wurde mittlerweile eine Vielzahl von Benzochinonen, Naphthochinonen sowie einfache chinoide Strukturen chemisch synthetisiert.

Die biologische Wirkung der Chinone ist allgemein auf gram positive Bakterien wesentlich stärker als auf gram negative (Ogilvie & Kersten 1979). Dies ist wahrscheinlich in der Hauptsache auf ihren stark hydrophoben Charakter zurückzuführen, der es diesen Substanzen sehr erschwert, die äußere Membran von gram negativen Bakterien zu durchdringen (Nikaido 1976, Datta et al. 1974). Eine Bestätigung hierfür ist auch die bei Werner et al. (1979) beschriebene Beobachtung, daß das Chinon-Antibioticum Gunacin eine starke Hemmung auf eine E. coli-Mutante ausübt, die im Gegensatz zum Wildtyp durch eine verminderte Permeationsbarriere für Antibiotica gekennzeichnet ist.

In diesem Zusammenhang sei auch auf ein Beispiel hingewiesen, bei dem die Chinongruppe in vitro weniger wichtig für die Wirksamkeit auf das Zielmolekül der RNS-Polymerase zu sein scheint als für das Eindringen des Antibioticums in die Zelle. Dies wird für den Naphthochinonchromophor von Rifamycin S diskutiert (Wehrli & Staehelin 1969).

Die Bildung von Semichinonradikalen als intrazelluläre Zwischenstufen bei auf die DNS wirkenden chinonhaltigen Antitumorsubstanzen kann nach den Untersuchungen von Bachur et al. (1978) an Microsomenfraktionen als gesichert angenommen werden. Darüberhinaus haben Lown et al. (1978) gezeigt, daß chemische Reduktion der Mitomycine zur Bildung

eines Semichinon-Radikal-Zwischenprodukts führt, und Tomasz et al. hatten bereits 1974 Hinweise darauf, daß ein solches Radikal kovalent an die DNS bindet. Eine vergleichbare Reduktion von Adriamycin und Daunorubicin zu Semichinonen führt offenbar ebenfalls zu kovalenter Bindung dieser Agentien an die DNS (Sinha & Chignell 1979). Ein möglicher Mechanismus der Reduktion zu solchen kovalent bindenden Strukturen findet sich beispielsweise bei Moore (1977).

Als allgemeines Prinzip kann also zumindest für diejenigen Chinonantibiotica, die eine Antitumoraktivität aufweisen, intrazelluläre Aktivierung zum Zustand des freien Radikals angesehen werden. Wegen ihrer hohen Affinität und zugleich selektiven Bindungsfähigkeit zu Nucleinsäuren können sie dann als sogenannte "site-specific free radicals" (Bachur et al. 1978) wirken, die an DNS (oder RNS) binden und dort entweder direkt reagieren oder über die Bildung eines sauerstoffabhängigen freien Radikals (z.B. Superoxid- oder Hydroxylradikal) die entsprechenden Schädigungen bewirken.

Für das hier beschriebene neue Antibioticum Halochinon läßt sich im biologischen Test neben der Wirkung auf Halobakterien die bei Chinonen typische, bevorzugte Hemmung von gram positiven Keimen feststellen (Arthrobakterien, Micrococcus, Mycobakterium, Propionibakterium, B.brevis). Mit Ausnahme von Proteus werden gram negative Bakterien nicht oder nur bei erheblich höheren Konzentrationen gehemmt.

Die ebenfalls gute Wirksamkeit gegen einige human- oder tierpathogene Mycoplasmastämme bietet einen weiteren Hinweis auf die wichtige Rolle der Zellwand als Permeationsbarriere.

Darüberhinaus wäre es von Interesse abzuklären, inwieweit sich die bei Halobakterien beobachtete hohe Sensitivität gegenüber diesem und anderen Chinonantibiotica (III. 1.2.) im Vergleich zu anderen Hemmstoffen auch bei weiteren Vertretern der Archaebakterien feststellen läßt.

Bei der Synthese von Derivaten scheint eine Verlängerung

der Seitenkette am C_3-Atom weniger sinnvoll, da das vergleichbare Pilochinon nur Spuren einer Aktivität gegen Halobakterien zeigt. Auch bei der Erstbeschreibung wurde für diese Substanz bis auf eine schwache in vitro Wirkung gegen Entamoeba histolytica und Mycobacterium tuberculosis (1oo µg/ml) keine biologische Aktivität in vivo beschrieben (Polonsky et al. 1963). Die erwähnte schwache Protozoenwirkung konnte bei Halochinon ebenfalls beobachtet werden (pers.Mitteilg. Dr. Gruner, Ciba, Basel). Gegen einen Mycobakterienstamm war die Aktivität jedoch mit einer minimalen Hemmkonzentration von 1 µg/ml weitaus stärker (vergl. III.6.1.).

Ob sich in dieser Richtung der Wirksamkeit gegen pathogene Keime noch Verbesserungen erzielen lassen, bleibt abzuwarten. Für einen therapeutischen Einsatz wird wohl in erster Linie die Verminderung der hohen Toxizität von Halochinon (pers. Mitteilg. Dr. Gruner, Ciba, Basel) entscheidend sein. Ein 5,7-diBrom-Derivat zeigte bei ersten Tests gegen Halobakterien eine deutlich verringerte Hemmwirkung im Vergleich zur Ausgangssubstanz.

Im Verlauf der Aufarbeitung und Isolierung erwies sich Halochinon als ein Indikator, dessen Löslichkeitsverhalten stark von den jeweils vorliegenden pH-Bedingungen abhängig ist. Im sauren und neutralen Bereich ist die Substanz stark lipophil und intensiv rot gefärbt, während sie bei pH 11,3 unter gleichzeitigem Übergang in die hydrophile Form nach blau-blauviolett umschlägt. Da die biologische Wirksamkeit dabei nicht verloren geht, scheint die hier erfolgte Verschiebung im aromatischen Ringsystem für die Wirksamkeit der Substanz in der Zelle nicht von entscheidender Bedeutung zu sein. Eine quantitative Aussage zu diesem Punkt ist jedoch aus zwei Gründen hier nicht zu treffen:

1) Aufgrund der extremen Abweichungen im Diffusionsverhalten auf Agarplatten können die im Plattendiffusionstest aufgetretenen Unterschiede in den Hemmhofdurchmessern nicht als Maß für einen Vergleich der Wirksamkeit beider

Formen des Antibioticums herangezogen werden.

2) Nach längerer Inkubationszeit der Platten, wie es durch das langsame Wachstum der Halobakterien notwendig wurde, konnte oftmals eine zunehmende Blaufärbung von ursprünglich mit roter Antibioticumlösung getränkten Rondellen beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, daß unter den in vivo vorliegenden Bedingungen von neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert (7,o - 8,o) das zugegebene Halochinon in seine hydrophile Form überwechselt. Man darf wohl davon ausgehen, daß intrazellulär beide Formen in ein gemeinsames Zwischenprodukt überführt werden.

Als entscheidende Kriterien für eine effektive Aufarbeitung und Reinigung von Halochinon erwiesen sich a) das Ansäuern der Kulturbrühe vor dem Filtrieren und b) das Imprägnieren des zur Chromatographie verwendeten Kieselgels mit Oxalsäure oder Weinsäure.

Die Identifizierung der weiteren farbigen Substanzen, die als Begleitkomponenten bei der Säulenchromatographie anfielen, aber keine erkennbare biologische Aktivität zeigten, könnte von Bedeutung für die einzuschlagende Richtung der Synthese von Halochinonderivaten sein. Eventuell handelt es sich hier - zumindest teilweise - um Vorstufen oder modifizierte Strukturen.

Die Frage nach antagonisierenden Substanzen des Mediums konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Zum einen bestehen zwischen Hemmhofdurchmessern auf komplexem und auf chemisch definiertem Nährboden nur geringe Differenzen, die durchaus auf eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit der Testorganismen zurückgeführt werden können. Zum anderen ist das Minimalmedium für Halobakterien aus derart vielen Komponenten, insbesondere 15 Aminosäuren, zusammengesetzt, daß der Einfluß eines einzelnen Bestandteils auf die Wirksamkeit von Halochinon so gut wie nicht zu erfassen ist, zumal das Wachstum auch schon durch das Fehlen von 1-2 Komponenten beeinträchtigt werden kann (Onishi et al. 1965).

Bei einem Kreuztest mit 1 und 1o mM Cystein konnte lediglich eine leichte Verengung des Hemmstreifens von Halochinon (1 mg/ml) von 15 auf 13-14 mm beobachtet werden. Diese Ergebnisse waren für komplexes und chemisch definiertes Medium sowie für beide Cystein-Lösungen identisch.

Die Antagonisierung einer Antibioticumwirkung durch SH-Reagentien, insbesondere durch die Aminosäure Cystein, wird z.B. für die Chinonantibiotica Granaticin, Aranciamycin, Naphthomycin und weiteren beschrieben (Ogilvie & Kersten 1979).

Obige Gegebenheiten werfen natürlich die Frage nach der Brauchbarkeit und Aussagekraft des eingesetzten Testorganismus Halobacterium cutirubrum auf. Hier stand jedoch die Erprobung eines solchen ungewöhnlichen Organismus nicht nur beim Screening, sondern auch bei den nachfolgenden Untersuchungen zur biologischen Wirkungsweise im Vordergrund. Obwohl aus diesem Grund bei der Durchführung einzelner Experimente etliche Abweichungen von sonst standardisiert verwendeten Testmethoden notwendig wurden, kann den daraus gewonnenen Ergebnissen jedoch sehr wohl eine vergleichbare Aussagekraft zuerkannt werden. Dies gilt zweifellos auch für die Versuche zum Einbau radioaktiv markierter Bausteine der Makromolekülsynthesen.

Aufgrund des abweichenden Zellwandaufbaus sollte der Einsatz von ^{14}C-Alanin beim Test auf Hemmung der Proteinsynthese keinen Anlaß zu Ergebnisverfälschungen bieten, etwa durch mitgemessenen und von der ribosomalen Proteinsynthese unabhängig ablaufenden Einbau von Alanin in die Zellwand. Dies ist für andere Bakterien zwar richtig, trifft jedoch nicht auf die Halobakterien zu, da hier als Zellwandgerüst ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von über 2oo ooo D vorliegt, dessen Proteinanteil intrazellulär am Ribosom synthetisiert wird und somit auch der Aminosäureeinbau in dieses Zellwand-Glycoprotein ribosomal kontrolliert und zusammen mit der gesamten Proteinsynthese dieses Ortes von einer entsprechenden Hemmung betroffen

sein sollte. ^{14}C-Alanin wurde verwendet, weil es von 4 getesteten Aminosäuren am besten aufgenommen wurde.

Das ausgesprochen einseitige Sensitivitätsspektrum der Halobakterien gegenüber einer Vielzahl von Antibiotica gibt Anlaß zu verschiedenartigen Spekulationen. Einerseits könnte dieses Verhalten weniger auf einer Eindringungsresistenz beruhen als vielmehr auf einem, im Vergleich zu den übrigen Bakterien anders strukturierten Wirkort.

In diese Richtung können auch die Versuche mit EDTA-Zusatz zum Medium interpretiert werden, der lediglich bei auch ohne Detergens gut wirksamen Substanzen zu einer entsprechenden Steigerung des Hemmhofdurchmessers führte. Die vorher bereits nicht aktiven Antibiotica blieben auch nach dieser Erniedrigung der Permeabilitätsbarriere unwirksam (vergl. III.1.3.).

Eine weitere Möglichkeit wäre die Inaktivierung des betreffenden Antibioticums entweder enzymatisch oder durch die ungewöhnlich hohen und anders gelagerten intrazellulären Ionenkonzentrationen bei Halobakterien. Insbesondere K^+ erreicht mit 4,57 M einen extrem hohen Wert (Dees & Oliver 1977, Gochauer & Kushner 1969, Dundas 1977).

Als Wirkort von Halochinon muß nach den bisher vorliegenden Ergebnissen die DNS angesehen werden. Dies ergibt sich aus den Einbauversuchen mit ^{14}C-Thymidin, wo die DNS-Synthese nach Halochinonzugabe drastisch gehemmt wurde (88 %), ebenso wie durch die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums im sichtbaren Bereich um 25 nm nach Inkubation von DNS mit Halochinon. Ein solches Verhalten wird generell als Anzeichen für eine direkte Wechselwirkung mit der DNS-Doppelhelix gewertet, zumeist als Interkalation zwischen einzelne Basenpaare (Swanbeck 1966). Im Falle von Halochinon liegt eine solche Wirkungsweise auch bereits von der planaren Struktur des Moleküls nahe.

Ob die eigentliche Wirkung ebenfalls - wie vorher für die Chinonantibiotica mit Antitumoreigenschaften ausgeführt -

über eine intrazelluläre Reduktion zum Semichinon-Radikal entsteht, das dann in Wechselwirkung mit der DNS treten kann, ist unsicher. Die vergleichsweise geringen reaktiven Möglichkeiten der Seitengruppen, sowie die bisher nicht nachweisbare Antitumorwirksamkeit lassen einen solchen Mechanismus eher unwahrscheinlich werden. Andererseits könnte die starke Toxizität doch wieder in dieser Hinsicht positiv interpretiert werden, wenn man davon ausgeht, daß hierdurch die etwaige Antitumoraktivität überdeckt wird.

Auch hier - bei den reaktiven Seitengruppen - wäre ein lohnenswerter Ansatz für entsprechende Derivatisierung des Grundmoleküls.

Ebenfalls weiteren Untersuchungen bleibt es überlassen zu prüfen, welcher Natur die bei Halochinon anzunehmende Wechselwirkung mit der DNS ist, ob die Einlagerung zwischen bestimmte Basenpaare der DNS erfolgt (z.B. GC-reiche Stellen) und wie das molekulare Verhältnis von Anzahl der Antibioticummoleküle zur Anzahl der Nucleotidpaare unter Sättigungsbedingungen aussieht.

Die im Wirkungsspektrum häufig beobachtete bakteriostatische Hemmung im Vorfeld einer Bakterizidie ist typisch für Chinone und wird ebenfalls bei vielen Antitumor-Wirkstoffen beschrieben. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet hierfür das Vorhandensein von Reparaturmechanismen in der Zelle, die bei Schädigungen, z.B. der DNS, aktiviert werden (Kenyon et al. 198o, Witkin 1976, Seeberg 1978). Desweiteren beschreiben Ogilvie & Kersten (1979) induzierbare bakterielle Resistenz gegenüber bakteriostatisch wirkenden Chinonen.

Die Produktion von Halochinon wurde nur auf komplexen Medien untersucht, da das Wachstum des Stammes auf Minimalmedium nur äußerst schwach war.

Bei der Variation der Zusammensetzung des Komplexmediums führt lediglich Sojamehl als alleinige N-Quelle zur Produktion von Halochinon im Kolbenversuch. Alle anderen ein-

zeln angebotenen N-Quellen waren hierfür ungeeignet. Als geeignetste C-Quellen zur Produktion in Kombination mit Sojamehl erwiesen sich Mannit, Stärke und Glyzerin, wobei das Produktionsmaximum zum Teil um 2 Tage differierte. Bei der letztlich verwendeten Kombination Sojamehl/Mannit hatten die Mengenverhältnisse der beiden Anteile zueinander keinen wesentlichen Einfluß auf die Höhe der Halochinonausbeute.

Da der Produzentenstamm nur sehr langsam wächst und eine Fermentation demzufolge je nach Volumen (Kolbenversuch oder 25 l-Fermentation) zwischen 1o und 16 Tagen benötigte, ergaben sich verschiedentlich Probleme mit Bacillus- oder anderen Sporen, die bei einigen Chargen Sojamehl durch die Sterilisationstechnik nicht vollständig eliminiert werden konnten. Dies führte zu Infektionen teilweise noch 2 Tage nach dem Beimpfen. Ein Test mit einem ungeöffnet und unbeimpft inkubierten Parallelansatz, der nach 48 h massiv mit Stäbchen infiziert war, wies ebenfalls in diese Richtung. Bei Versuchen im Kolbenmaßstab waren keine Probleme solcher Art aufgetreten.

Aus den genannten Gründen wurde die eingesetzte Menge an Sojamehl bei 2 % belassen, obwohl eine leichte Ausbutesteigerung bei 3 % möglich gewesen wäre.

Zusätze verschiedener Wachstumsfaktoren wie Vitamine oder Spurenelemente hatten kaum Einfluß auf die gebildete Menge an Halochinon, könnten aber bei zukünftigen Fermentationen durch die beobachtete Verstärkung des Zellwachstums gerade im Anfangsstadium einer Inkubation wertvoll sein. Dies gilt speziell für Biotin (vergl. II.3.).

Eine Ausbeutesteigerung von ursprünglich 8o mg/l auf 14o-15o mg/l im Kolben wurde durch Klonen auf Hefe-Malz-Agarplatten erreicht. Hierzu wurden solche Kolonien ausgewählt, die intensiv im Luftmyzel gefärbt waren und auch von der Plattenunterseite her betrachtet dunkel erschienen. Eine frühe oder besonders ausgeprägte Sporulation konnte mit guter Produktion von Halochinon nicht korreliert werden.

Ob die beobachtete Färbung auf diesen Platten durch eine Antibioticumproduktion zustande kommt, wurde nicht weiter überprüft. Es ist lediglich anzumerken, daß immer wieder Kolonien auftraten, die im Luftmyzel zwar sehr ähnlich wie die guten Produzenten aussahen, von der Unterseite her aber nicht dunkel erschienen und auch in der Halochinonproduktion schlecht waren. Obwohl bei den Kombinationsversuchen mit verschiedenen C- und N-Quellen bei Verwendung von Malzextrakt oder Hefeextrakt allein keine Produktion gemessen wurde, kann eine Kombination beider N-Quellen eventuell doch zu einer Produktion von Halochinon führen. Zusätzlich scheint bei dem Flüssigmedium der emulgierenden Wirkung von Sojamehl (Vollfettstufe) eine nicht geringe Bedeutung zuzukommen. Die Lösung von produziertem Antibioticum von der Zelle weg ins umgebende Medium ist gerade bei stark lipophilen Substanzen nicht bei jeder Nährlösung in dem Ausmaß möglich, wie es für eine Produktion des Antibioticums in größeren Mengen erforderlich wäre.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Biogenese einer Substanz. Wie die Struktur von Halochinon und die anderer Chinone erkennen läßt, und wie es auch bereits für die Synthese des Pilochinon beschrieben wurde, ist der Weg über den Fettsäurestoffwechsel und damit der Aufbau aus Acetatbausteinen zu vermuten (Polonsky et al. 1963, Tanaka et al. 1975, Werner et al. 1979). Demzufolge sollte gerade Sojamehl mit seinem hohen Fettgehalt als Nährlösungsbestandteil zu guten Ausbeuten an Halochinon führen. Bei Kolbenversuchen ohne Schikane wurden beispielsweise rote Fettröpfchen beobachtet, die auf der Kulturoberfläche schwammen und konzentriertes Halochinon enthielten.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene neue Antibioticum wurde in einem Screening mit Halobakterien als speziellen Testkeimen aufgefunden. Es gehört ebenso wie Granaticin und Mitomycin zur Gruppe der Chinone, die sich im Sensitivitätsspektrum gegen Halobakterien als besonders gut wirksam erwiesen. Es sind dies alles Substanzen, die

direkt mit der DNS reagieren oder in den Nucleinsäurestoffwechsel allgemein eingreifen; lediglich Bacitracin bildet als Zellwandsynthesehemmstoff hier eine Ausnahme. Ein für Archaebakterien spezifischer Hemmstoff, der die Sonderstellung dieser Organismengruppe von einer weiteren Seite her bekräftigen würde, steht allerdings bisher noch aus.

Durch die Wahl der Testorganismen im Screening kann auch im Falle der Halobakterien eine Vorauswahl in Richtung bestimmter erwünschter Stoffklassen oder Wirkungsschwerpunkte getroffen werden. Da die DNS als Angriffsort von Antibiotica bisher lediglich für die Tumortherapie interessant ist, ist eine solche Differenzierungsmöglichkeit bereits zu Beginn der Isolierung einer neuen Substanz sicherlich oftmals nützlich und wünschenswert.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Halochinon ist ein neues, aus Kulturen von Streptomyces venezuelae isoliertes Chinonantibioticum.

Es wurde in einem Engspektrumscreening mit dem Testorganismus Halobacterium cutirubrum aus der Gruppe der Archaebakterien aufgefunden.

Die Verbindung zeigt Indikatoreigenschaften und ist strukturell eng verwandt mit dem aus Streptomyces pilosus isolierten Farbstoff Pilochinon. Die chemische Bezeichnung für Halochinon lautet:
3-Acetyl-1,8-dihydroxy-2-methyl-9,1o-phenanthrenchinon.

Das Wirkungsspektrum von Halochinon beschränkt sich auf Bakterien, wobei neben den im Screening eingesetzten Halobakterien hauptsächlich gram positive Keime und Mycoplasmen gehemmt werden.

Die MHK-Werte für Bakterizidie liegen hier bei 1-1o µg/ml. Oftmals geht der bakteriziden Wirkung eine bei um den Faktor 1o geringeren Konzentrationen bakteriostatische Hemmung voraus.

Der Angriffsort von Halochinon ist nach den vorliegenden Ergebnissen die DNS. Vermutlich erfolgt eine Interkalation mit nachfolgender Hemmung der Template-Funktion der DNS.

Eine Antitumorwirkung, wie für viele Hemmstoffe der DNS-Ablesung beschrieben, konnte bisher für Halochinon nicht nachgewiesen werden, was eventuell auf die geringe Löslichkeit zurückzuführen ist.

Die Verbindung ist vergleichsweise stark cytotoxisch.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Auden, J., J. Gruner, J. Nüesch, F. Knüsel (1967):
Some statistical methods in nutrient medium optimalisation
Path. Microbiol. 3o, 858-866

Bachur, N.R., S.L. Gordon, M.V. Gee (1978)
A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals
Cancer Res. 38, 1745-175o

Behrends, N.H. (1974):
In: Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces
E.Y.S. Lee, E.E. Smith (eds.) p. 159-18o
Academic Press, New York

Bérdy, J. (1974):
Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure
Adv. Appl. Microbiol. 18, 3o4-4o6

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
Buchanan, R.E., N.E. Gibbons (eds.)
8th edition, 1974
The Williams and Wilkins Company, Baltimore

Brecht-Fischer, A., H. Zähner, H. Laatsch (1979):
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen
183. Mitteilung. Imacidin, ein neues Acylpeptid-antibioticum aus Streptomyces olivaceus
Arch. Microbiol. 122, 219-229

Caplan, S.R., M. Ginzburg, eds. (1978):
Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms
Biomedical Press, Elsevier/North-Holland

Datta, N., R.W. Hedges, D. Becker, J. Davies (1974):
Plasmid-determined fusidic acid resistance in the enterobacteriaceae
J. Gen. Microbiol. 83, 191-196

Daum, S.J., J.R. Lemke (1979):
Mutational biosynthesis of new antibiotics
Annu. Rev. Microbiol. 33, 241-265

Dees, C., J.D. Oliver (1977):
Growth inhibition of Halobacterium cutirubrum by cerulenin, a potent inhibitor of fatty acid synthesis
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 36-44

Driscoll, J.S. (1974):
Quinone structure - antitumor activity relationships
Cancer Chemother. Rep. 4, 3-4

Dundas, I.E.D. (1977):
Physiology of Halobacteriaceae
In: Advances in Microbial Physiology, 15
A.H. Rose and D.W. Tempest (eds.) p. 85-12o
Academic Press, London

Dundas, I. (1978):
The normal Halobacteriaceae, the general physiology and taxonomy of a well adapted and highly successfull group of microorganisms
In: Energetics and Structure of Halophilic Micro-organisms
S.R. Caplan and M. Ginzburg (eds.) p. 641-651
Biomedical Press, Elsevier/North-Holland

Eikhom, T.S., J. Johnson, S. Laland, T. Refsvik (1963):
On the biosynthesis of Gramicidin S
Biochim. Biophys. Acta 76, 465-468

Ernster, L., I.-Y. Lee, B. Norling, B. Persson (1969):
Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. Essentiality of ubiquinone for the interaction of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and cytochrome b
Eur. J. Biochem. 9, 299-310

Gabbay, E.J., D. Grier, R.E. Fingerle, R. Reimer, R. Levy, S.W. Pearche, W.D. Wilson (1976):
Interaction specifity of the anthracyclines with deoxyribonucleic acid
Biochemistry 15, 2062-2070

Gaudemer, A., J. Polonsky, L. Alais (1963):
Spectres de résonance magnétique nucleaire de la piloquinone et de ses dérives
Bull. Soc. Chim. Fr., 1918-1923

Gochauer, M.B., D.J. Kushner (1969):
Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria
Can. J. Microbiol. 15, 1157-1165

Gutman, M., E.B. Kearney, T.P. Singer (1971 a):
Regulation of succinate dehydrogenase activity by reduced coenzyme Q_{10}
Biochemistry 10, 2726-2733

Gutman, M., E.B. Kearney, T.P. Singer (1971 b):
Control of succinate dehydrogenase in mitochondria
Biochemistry 10, 4762-4770

Hagenmaier, H., K.H. Jaschke, L. Santo, M. Scheer. H. Zähner (1976):
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 158. Mitteilung. Tirandamycin B
Arch. Mikrobiol. 109, 65-74

Hasenböhler, A., H. Kneifel, W.A. König, H. Zähner, H.-J. Zeiler (1974):
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 134. Mitteilung. Stenothricin, ein neuer Hemmstoff der bakteriellen Zellwandsynthese
Arch. Mikrobiol. 99, 3o7-321

Higashi, Y., J.L. Strominger, C.C. Sweeley (1967):
Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of a C_{55} isoprenoid alcohol
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 1878-1884

Hoagland, D.R. (1932):
Mineral nutrition of plants
Annu. Rev. Biochem. 1, 618-636

Hoagland, D.R. (1933):
Mineral nutrition of plants.
Annu. Rev. Biochem. 2, 471-484

Hoffmann-Ostenhof, E. (1963):
Enzyme inhibition by quinones
In: Metabolic Inhibitors Vol II,
R.M. Hochster, J.M. Quastel (eds.) p. 145-159
Academic Press, New York - London

Hütter, R. (1967):
Systematik der Streptomyceten
Verlag S. Karger, Basel - New York

Johnson, B.C., P. Cohen, J. Polonsky, E. Lederer (1963):
Piloquinone: a new phenanthrene - o - quinone isolated from the mycelium of Streptomyces pilosus
Nature 199, 285-286

Kandler, O. (1979):
Zellwandstrukturen bei Methan-Bakterien
Naturwissenschaften 66, 95-1o5

Kavanagh, F. (1963):
Dilution methods of antibiotic assays
In: Analytical Microbiology, p. 125-14o
Academic Press, New York

Kenyon, C.J., G.C. Walker (198o):
DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in Escherichia coli
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2819-2823

Kersten, W. (1971):
Inhibition of RNA synthesis by quinone antibiotics
Progr. Mol. Subcell. Biol. 2, 48-57

Kersten, W., A. Ogilvie (1975):
Inducing regulatory processes by means of quinone antibiotics
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 371-372

Kieslich, K. (1978):
Microbial transformations - type reactions
In: Antibiotics and other secondary metabolites,
R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch and W. Wehrli (eds.) p. 57-85
Academic Press, London - New York - San Francisco

Kirst, G. (1971):
Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis
Dissertation, Universität Tübingen

Kröger, A., M. Klingenberg (1973):
Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin
Eur. J. Biochem. 39, 313-323

Kurylowicz, W. (1976):
Antibiotics. A critical review
Pol. Med. Publ., Warsaw

Kwok, Y., T.F. Wong (1979):
Evolutionary relationship between Halobacterium cutirubrum and eucaryotes determined by use of aminoacyl tRNA synthetases as phylogenetic probes
Can. J. Biochem. 58, 213-218

Lennarz, W.J. (1975):
Lipid linked sugars in glycoprotein synthesis. The oligosaccharide chain of certain glycoproteins is preassembled on a polyprenol carrier
Science 188, 986-991

Lewis, J.C., K. Iljichi (1957):
Multiple factor experimentation with reference to biosynthetic yield of Aterrimin
Appl. Microbiol. 5 124-13o

Lounasmaa, M., J. Zylber (1969):
Sur l'isolement et la structure de l'hydroxy-4 piloquinone, deuxième o-phènanthrènequinone de Streptomyces pilosus
Bull. Soc. Chim. Fr., 31oo-31o3

Lown, J.W., S.-K. Sim, H.-H. Chen (1978):
Hydroxyl radical production by free and DNA-bound aminoquinone antibiotics and its role in DNA degradation. Electron spin resonance detection of hydroxyl radicals by spin trapping
Can. J. Biochem. 56, 1o42-1o47

Magrum, L.J., K.R. Luehrsen, C.R. Woese (1978):
Are axtreme halophiles actually "Bacteria"?
J. Mol. Evol. 11, 1-8

Mescher, M.F., J.L. Strominger (1975):
Bacitracin induces sphere formation in Halobacterium species which lack a wall peptidoglycan
J. Gen. Microbiol. 89, 375-378

Mescher, M.F., J.L. Strominger (1978):
The cell surface glycoprotein of Halobacterium salinarium
In: Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms
S.R. Caplan and M. Ginzburg (eds.) p. 5o3-511
Biomedical Press, Elsevier/North-Holland

Moore, H.W. (1977):
Bioactivation as a model for drug design bioreductive alkylation
Science 197, 527-532

Nelson, B.D., B. Norling, B. Persson, L. Ernster (1972):
Influence of ubiquinone on the rate of antimycin binding to submitochondrial particles
Biochim. Biophys. Acta 267, 2o5-21o

Nikaido, H. (1976):
Outer membranes of Salmonella typhimurium,transmembrane diffusion of some hydrophobic substances
Biochim. Biophys. Acta 433, 118-132

Ogilvie, A., W. Kersten (1979):
Quinone Antibiotics
In: Antibiotics V (I), F.E. Hahn, ed.,
mechanism of action of antibacterial agents p. 243-263
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

Onishi, H., M.E. McCance, N.E. Gibbons (1965):
A synthetic medium for extremely halophilic bacteria
Can. J. Microbiol. 11, 365-373

Pigram, W.J., W. Fuller, L.D. Hamilton (1972):
Stereochemistry of intercalation: interaction of Daunomycin with DNA
Nature, New Biol. 235, 17-19

Polonsky, J., B.C. Johnsen, P. Cohen, E. Lederer (1963):
Sur la structure chimique de la piloquinone, nouvelle o-phénanthrènequinone isolée par Streptomyces pilosus
Bull. Soc. Chim. Fr. 1907-1917

Quinn, P.J., M.A. Esfahani (1980):
Ubiquinones have surface-active properties suited to transport electrons and protons across membranes
Biochem. J. 185, 715-722

Santo, L. (1976):
Suche nach Antibiotika mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien, Tirandamycin A und B
Dissertation, Universität Tübingen

Sartiano, G.P., W.E. Lynch, W.D. Bullington (1979):
Mechanism of action of the anthracycline anti-tumor antibiotics, Doxorubicin, Daunomycin and Rubidazone: preferential inhibition of DNA polymerase α
J. Antibiot. 32, 1038-1045

Schildknecht, H. (1970):
Die Wehrchemie von Land- und Wasserkäfern
Angew. Chem. 82, 17-25

Schildknecht, H. (1971):
Evolutionary peaks in the defensive chemistry of insects
Endeavour 20, 136-141

Schleifer, K.H., O. Kandler (1972):
Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications
Bacteriol. Rev. 36, 4o7-477

Seeberg, E. (1978):
Reconstitution of an Escherichia coli repair endonuclease activity from the separated $uvrA^+$ and $uvrB^+$/$uvrC^+$ gene products
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2569-2573

Seghal, S.N., N.E. Gibbons (196o):
Effect of some metal ions on the growth of Halobacterium cutirubrum
Can. J. Microbiol. 6, 165-169

Sinha, B.K., C.F. Chignell (1979):
Binding mode of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA
Chem. Biol. Interact. 28, 3o1-3o8

Stackebrandt, E., C.R. Woese (1979):
Primärstruktur der ribosomalen 16S RNS - ein Marker der Evolution der Prokaryonten
Forum Mikrobiologie 2, 183-19o

Stahl, E. (1967):
Dünnschichtchromatographie
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

Steensland, H., H. Larsen (1969):
A study of the cell envelope of the Halobacteria
J. Gen. Microbiol. 55, 325-336

Swanbeck, G. (1966):
Interaction between deoxyribonucleic acid and some anthracene and anthraquinone derivatives
Biochim. Biophys. Acta 123, 63o-633

Tanaka, H., Y. Koyama, T. Nagai, H. Marumo, S. Omura (1975):
Nanaomycins, new antibiotics produces by a strain of Streptomyces. II. Structure and biosynthesis
J. Antibiot. 28, 868-875

Tomasz, M., C.M. Mercado, J. Olson, N. Chatterjie (1974):
The mode of interaction of Mitomycin C with deoxyribonucleic acid and other polynucleotides in vitro
Biochemistry 13, 4878-4887

Vogel, F.S., R.F. Weaver (1972):
Concerning the induction of dormancy in spores of Agaricus bisporus
Exp. Cell Res. 75, 95-1o4

Vogel, F.S., S.J. McGarry, L.A.K. Kemper, D.G. Graham (1974):
Bactericidal properties of a class of quinoid compounds related to sporulation in the mushroom, Agaricus bisporus
Am. J. Pathol. 75, 165-174

Vogel, F.S., L.A.K. Kemper, S.J. McGarry, D.G. Graham (1975):
Cytostatic cytocidal and potential antitumor properties of a class of quinoid compounds, initiators of the dormant state in the spores of Agaricus bisporus
Am. J. Pathol. 78, 33-46

Wehrli, W., M. Staehelin (1969):
The rifamycins - relation of chemical structure and action on RNA polymerase
Biochim. Biophys. Acta 182, 24-29

Weinberg, E.D. (197o):
Biosynthesis of secondary metabolites: Roles of trace metals
Adv. Microb. Physiol. 4, 1-44

Werner, R.G., K.-R. Appel, W.M.A. Merk (1979):
Gunacin, a new quinone antibiotic from Ustilago sp.
J. Antibiot. 32, 1104-1111

Witkin, E.M. (1976):
Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli
Bacteriol. Rev. 40, 869-907

Woese, C.R., G.E. Fox (1977 a):
Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090

Woese, C.R., G.E. Fox (1977 b):
The concept of molecular evolution
J. Mol. Evol. 10, 1-6

Woese, C.R., L.J. Magrum, G.E. Fox (1978):
Archaebacteria
J. Mol. Evol. 11, 245-252

Woese, C.R., J. Gibson, G.E. Fox (1980):
Do genealogical patterns in purple photosynthetic bacteria reflect interspecific gene transfer?
Nature 283, 212-214

Wolf, H., H. Zähner, K. Nierhaus (1972):
Kirromycin, an inhibitor of the 30S ribosomal subunits function
FEBS Lett. 21, 347-350

Wright, A., M. Dankert, P. Fennessey, P.W. Robbins (1967):
Characterization of a polyisoprenoid compound functional in O-antigen biosynthesis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 1798-1803

Zähner, H. (1978):
The search for new secondary metabolites
In: Antibiotics and other secondary metabolites,
R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch, W. Wehrli (eds.)
p. 1-17
Academic Press, London - New York - San Francisco

Zähner, H., W.K. Maas (1972):
Biology of Antibiotics
Springer-Verlag, New-York - Heidelberg - Berlin

Zitzmann, W. (198o):
Brevienomycine. Auftrennung und Charakterisierung eines komplexen Antibiotikagemisches aus Streptomyces violaceoniger Tü 1612
Dissertation, Universität Tübingen

Zunino, F., R. Gambetta, A. Dimarco, A. Zaccara (1972):
Interaction of Daunomycin and its derivatives with DNA
Biochim. Biophys. Acta 277, 489-498

Zylber, J., E. Zissmann, J. Polonsky, E. Lederer (1969):
Sur la biosynthèse de la piloquinone, o-phénanthrène-quinone produit par Streptomyces pilosus
Eur. J. Biochem. 1o, 278-283

Lebenslauf

29.6.1953	geboren in Soest/Westfalen
1960-1964	Volksschule in Soest
1964-1972	Städt. Neusprachl. Gymnasium, Soest
15.5.1972	Reifeprüfung am Städt. Neusprachl. Gymnasium, Soest
ab WS 1972/73	Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
8.10.1974	Diplom-Vorprüfung in Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
ab SS 1975	Biologiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
19.5.1978	Diplomprüfung in Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
ab Nov. 1978	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545/8791